

Transkriptionelle Regulation des Erythropoietin-Rezeptor-Gens im zentralen Nervensystem

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Ing. (FH) Iwona Wallach, geb. Palaszewski
7. Juli 1976, Tarnowitz/Polen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
 2. Prof. Dr. Christof Dame
 3. Prof. Dr. Joachim Fandrey

Tag der mündlichen Prüfung: 28. August 2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
-------------------------	---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
----------------------------	----

ZUSAMMENFASSUNG	IX
-----------------------	----

1 EINLEITUNG	1
---------------------------	----------

1.1 Erythropoietin (Epo).....	1
-------------------------------	---

1.1.1 Epo in der Hämatopoiese.....	1
------------------------------------	---

1.1.2 Epo in nicht-hämatopoietischen Organen.....	1
---	---

1.2 Der Erythropoietin-Rezeptor (EpoR)	3
--	---

1.2.1 Struktur und Aktivierung des EpoR.....	3
--	---

1.2.2 EpoR-Expression	5
-----------------------------	---

1.2.3 EpoR-Regulation	6
-----------------------------	---

1.3 GATA-Transkriptionsfaktoren	8
---------------------------------------	---

1.3.1 Struktur und Funktion der GATA-Transkriptionsfaktoren.....	8
--	---

1.3.2 GATA-Transkriptionsfaktoren im zentralen Nervensystem.....	9
--	---

1.4 Ziel der Arbeit	11
---------------------------	----

2 MATERIAL.....	12
------------------------	-----------

2.1 Material und Hersteller.....	12
----------------------------------	----

2.1.1 Chemikalien.....	12
------------------------	----

2.1.2 Enzyme	15
--------------------	----

2.1.3 Puffer und Lösungen.....	16
--------------------------------	----

2.1.4 Kommerzielle Assay-Systeme.....	17
---------------------------------------	----

2.1.5 DNA- und Protein-Marker.....	18
------------------------------------	----

2.2 Bakterien, Zelllinien, Tiere.....	18
---------------------------------------	----

2.2.1 Bakterien.....	18
----------------------	----

2.2.1.1 Bakterienstämme.....	18
------------------------------	----

2.2.1.2 Nährmedien für Bakterienstämme	19
--	----

2.2.2 Humane Zelllinien und Zellkulturmedien.....	19
---	----

2.2.3	Tiere	20
2.3	Plasmide	21
2.3.1	Expressionsvektoren	21
2.3.2	Reportergenvektoren	22
2.4	Oligonukleotide	22
2.4.1	Primer für RT-PCR	22
2.4.2	Oligonukleotide für den Electrophoretic Mobility Shift Assay	24
2.4.3	Primer zur Klonierung der Expressionsvektoren	25
2.4.4	Primer zur Klonierung und Mutagenese der Reportergen-Konstrukte	26
2.4.5	TaqMan® Gene Expression Assays	27
2.4.6	<i>Silencer</i> ® Pre-Designed siRNA	27
2.4.7	Primer für den Chromatin-Immunpräzipitations-Assay	28
2.5	Antikörper	28
2.6	Computerprogramme	30
2.7	Geräte	30
2.8	Sonstige Materialien	32
3	METHODEN	33
3.1	Zellkultur	33
3.1.1	Kultivierung der Zellen	33
3.1.2	Transfektion von Zellkulturen	33
3.1.2.1	Transiente Transfektion mit Vektoren	33
3.1.2.2	Transiente Transfektion mit <i>small interfering</i> RNA (siRNA)	34
3.1.2.3	Stabile Transfektion mit Vektoren	34
3.2	Reportergen-Assays	34
3.3	RNA- und DNA-Techniken	35
3.3.1	RNA-Isolierung und -Quantifizierung	35
3.3.2	Reverse Transkription (RT)	35
3.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
3.3.3.1	Genexpressionsanalysen	36
3.3.3.2	Fragmentamplifizierung zur Klonierung	36
3.3.3.3	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Mutagenese von Reportergen-Konstrukten mittels Overlap-Extension-PCR	38
3.3.3.4	Amplifizierung von genregulierenden Sequenzen	39
3.3.4	Real-time PCR	39

3.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.3.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	40
3.3.7	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	40
3.3.7.1	DNA-Verdau für die Ligation	40
3.3.7.2	Kontrolle von DNA-Präparationen	41
3.3.8	Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden	41
3.3.9	DNA-Aufreinigung	41
3.3.9.1	Phenol-Chloroform-DNA-Extraktion	41
3.3.9.2	DNA-Fällung	42
3.3.10	Ligation	42
3.3.11	Transformation von Bakterien	42
3.3.12	Plasmid-Präparation	43
3.3.12.1	Minipräparation	43
3.3.12.2	Maxipräparation	43
3.3.13	DNA-Quantifizierung	44
3.4	Protein-Techniken	45
3.4.1	Ganzzellprotein-Extrakte	45
3.4.1.1	Extraktion mit 1x Probenpuffer	45
3.4.1.2	Extraktion mit RIPA-Puffer	45
3.4.2	Kernprotein-Extrakte	45
3.4.3	Proteinquantifizierung	46
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.4.5	Western Blot	46
3.5	DNA-Protein-Bindungsstudien	48
3.5.1	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	48
3.5.1.1	Herstellung der Sonden	48
3.5.1.2	Herstellung der Kompetitoren	48
3.5.1.3	Polyacrylamid-Gele	48
3.5.1.4	EMSA-Experiment	49
3.5.2	Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay)	49
3.6	Immunhistochemie	50
3.6.1	Tierpräparationen und Gewebefixierung	50
3.6.2	Kryokonservierung und Gewebeschnitte	51
3.6.3	Immunhistologische Färbungen	51
3.6.4	Bildaufnahme und digitale Bildbearbeitung	53

3.7	Statistische Analysen.....	53
4	ERGEBNISSE	54
4.1	Immunhistochemie im zentralen Nervensystem (ZNS) der embryonalen und fetalen Maus...	54
4.1.1	EpoR	54
4.1.2	GATA-Transkriptionsfaktoren	56
4.1.3	Sp1	63
4.2	Expression der mRNA von <i>GATA-2</i> , <i>-3</i> , <i>-4</i> und <i>EpoR</i> in unterschiedlichen Arealen des humanen fetalen Nervensystems	66
4.3	Screening von Zelllinien mit neuronalem Phänotyp auf die Expression von GATA-Transkriptionsfaktoren, Epo und EpoR.....	67
4.4	<i>In vitro</i> -Nachweis der Bindung von GATA-2, -3 und -4 an die 5'-flankierende Region des <i>EpoR</i>	69
4.5	Reporter-gen-Assays.....	71
4.5.1	Klonierung und Mutagenese der Konstrukte	71
4.5.2	Basale Aktivität von Fragmenten aus der 5'-flankierenden Region des <i>EpoR</i> -Gens	72
4.5.3	Einfluss von GATA-2, GATA-3, GATA-4 und Sp1 auf die Aktivität von Fragmenten aus der 5'-flankierenden Region des <i>EpoR</i> -Gens	75
4.6	Effekte von GATA-2, GATA-3, GATA-4 und Sp1 auf die EpoR-Expression in humanen Zelllinien	77
4.6.1	Transiente Transfektion von unterschiedlichen Zelllinien mit GATA-2, -3 oder -4	77
4.6.2	Stabile Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit GATA-2, -3 oder -4	79
4.6.3	Co-Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit Sp1 und GATA-2, -3 oder -4.....	85
4.6.4	RNA-Interferenz	86
4.7	<i>In vivo</i> -Nachweis der Bindung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren an regulierende Sequenzen des <i>EpoR</i> -Gens	88
5	DISKUSSION	91
5.1	Relevanz des Epo/EpoR-Systems im ZNS	91
5.2	Expression des <i>EpoR</i> und potentieller Regulatoren seiner Genexpression <i>in vivo</i>	92
5.3	Rolle der GATA-Transkriptionsfaktoren bei der <i>EpoR</i> -Genregulation	97
5.4	Bedeutung von Co-Faktoren und anderen Transkriptionsfaktoren für die <i>EpoR</i> -Genregulation	103
5.5	Schlussfolgerung	108
6	LITERATUR.....	110

Inhaltsverzeichnis	V
<hr/>	
PUBLIKATIONEN, PREISE, STIPENDIEN	A
ERKLÄRUNG.....	C
DANKSAGUNG.....	D

Abkürzungsverzeichnis

AP	<i>Activator protein</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β cR	<i>Common β receptor</i>
BFU-E	<i>Burst-forming unit-erythroid</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFU-E	<i>Colony-forming unit-erythroid</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat(e)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der embryonalen bzw. fetalen Entwicklung
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
FOG-1/2	<i>Friend of GATA-1/2</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
HDR	<i>Hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HNF	<i>Hepatic nuclear factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAK2	Janus-Kinase 2
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mut	Mutation, mutiert
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
OD	Optische Dichte
OE-PCR	Overlap-Extension-PCR
P	Phosphat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pc	<i>Post conceptionem</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PEG	Poly(ethylenglykol)
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
rEpo	Rekombinantes Epo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkription
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHP	<i>SH-2 domain-containing proteins</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>

Sp1	<i>Simian-virus-40-protein-1/Specificity protein 1</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T _A	Annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween®20
TE	Tris EDTA
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i>
YY1	<i>Yin and Yang 1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Der Erythropoietin-Rezeptor (EpoR) wird nicht nur in hämatopoietischen Zellen, wo er die Wirkung von Erythropoietin (Epo) bei der Erythropoiese vermittelt, sondern auch in anderen Geweben, wie dem zentralen Nervensystem (ZNS), exprimiert. Die Mechanismen der transkriptionellen Regulation des *EpoR* in Nervenzellen sind ungeklärt, aber von besonderem Interesse für die klinische Anwendung von rekombinantem Epo (rEpo) zur Neuroprotektion. rEpo induziert die Produktion anti-apoptotischer Faktoren, reduziert peri-neuronale Entzündungsprozesse, wirkt anti-oxidativ und beeinflusst die Umgebung pluripotenter Stammzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob GATA-Transkriptionsfaktoren, für die sich mehrere potentielle Bindungsstellen in der 5'-flankierenden Region des *EpoR* befinden, für die Regulation der Expression dieses Gens im ZNS von Bedeutung sind, da GATA-1 bereits als ein Aktivator der *EpoR*-Genexpression in hämatopoietischen Zellen identifiziert wurde.

In humanen SH-SY5Y Zellen, die einen neuronalen Phänotyp haben, konnte die *in vitro*-Bindung der Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3 und -4 an die *EpoR* 5'-flankierende Region demonstriert werden. Reporter-gen-Assays zeigten, dass die Region des *EpoR*-Gens von Position -316 bis -285 relativ zur Transkriptionsstartstelle für die Transkription des Reportergens relevant ist. Diese Region enthält Cluster von sich teilweise überlappenden Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren, von denen für einige unter *in vivo*-Bedingungen eine Bindung an die *EpoR* 5'-flankierende Region gezeigt werden konnte. Während die Überexpression der GATA-Transkriptionsfaktoren in einer Aktivierung der Reporter-gen-Expression resultierte, wurde unter Normoxie die endogene *EpoR*-Expression davon nicht beeinflusst. Unter Hypoxie, die per se eine signifikante Stimulation der *EpoR*-Expression in Kontrollzellen bewirkte, führten die verstärkt exprimierten GATA-Faktoren zu einer verringerten *EpoR* mRNA-Expression. Die Zugabe von rEpo hatte keinen Einfluss auf die *EpoR*-Expression. Mittels RNA-Interferenz wurde ferner bestätigt, dass die GATA-Faktoren unter Normoxie keinen signifikanten Einfluss auf die *EpoR*-Expression ausüben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die Regulation des *EpoR*-Gens in neuronalen Zellen von der in hämatopoietischen Zellen grundlegend unterscheidet. Während in hämatopoietischen Zellen GATA-1 ein bedeutender Aktivator ist, der über die Bindung am minimalen Promotor (-75/+33 relativ zur Transkriptionsstartstelle) wirkt, spielen die GATA-Transkriptionsfaktoren keine wesentliche Rolle bei der *EpoR*-Expression in neuronalen Zellen. Hier wird die *EpoR*-Expression offensichtlich von einem oder mehreren Komplexen aus unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren reguliert, die an einem weiter stromaufwärts gelegenen Abschnitt der 5'-flankierenden Region (-316/-285) binden.

Zusätzlich zu den neuen Erkenntnissen über die Regulation der *EpoR*-Expression konnten im Rahmen dieser Arbeit einerseits grundlegende Informationen über die Expressionmuster der Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3 und -4 sowie Sp1 während der Entwicklung des murinen Nervensystems gewonnen werden. Dazu zählt auch die Erkenntnis, dass die Expression von GATA-2, -3 und -4 in neuronalen Vorläuferzellen unter Hypoxie stimuliert wird.

1 EINLEITUNG

1.1 Erythropoietin (Epo)

1.1.1 Epo in der Hämatopoiese

Erythropoietin (Epo), ein ca. 30 kDa großes Glykoprotein, ist der primäre humorale Regulator der Erythropoiese, wobei es sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung erythrozytärer Vorläuferzellen stimuliert und die Apoptose dieser Zellen hemmt [1]. Das hämatopoietisch relevante Epo wird zunächst in der fetalen Leber produziert. Die primäre Epo-Produktionsstätte wechselt jedoch von der Leber zur Niere. Beim Menschen beginnt dieser Switch im Gestationsalter von 30 Wochen und ist erst nach der Neugeborenenperiode abgeschlossen [2]. Dieser ontogenetische Wechsel der primären Synthesstätte existiert in verschiedenen Säugerspezies und ist speziesabhängig reguliert.

Die Epo-Synthese findet unter Normoxie auf einem niedrigen basalen Level statt, wird aber durch eine verminderte Gewebeoxygenierung stimuliert. Die Epo-Produktion wird bei schwerer Hypoxie bis zu 1.000-fach gesteigert. Die so erhöhte Anzahl von Erythrozyten steigert die Kapazität des Blutes, Sauerstoff zu transportieren, was wiederum die Gewebeoxygenierung verbessert und über eine negative Rückkopplung die Epo-Synthese begrenzt [1].

1.1.2 Epo in nicht-hämatopoietischen Organen

Epo-mRNA wurde außer in Leber und Niere auch im Knochenmark sowie in vielen nicht-hämatopoietischen Geweben nachgewiesen, wie in der Milz, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge, in den Reproduktionsorganen sowie im ZNS [2, 3, 4] (zusammengefasst in [5]). Klinisch interessant sind vor allem die neuro- und kardio-protektiven Eigenschaften des Epo.

Die neuroprotektive Wirkung von rEpo im ZNS wurde sowohl in Zellkulturen als auch in unterschiedlichen Tiermodellen beschrieben. *In vitro*-Experimente zeigen, dass rEpo dosisabhängig den Zelltod von neuronalen Primärkulturen (aus dem murinen Cortex, Hippocampus oder ganzen Gehirn) bzw. von Zellkulturen mit neuronalem Phänotyp (NT2, hNT, SN6 oder PC12 Zellen) nach Belastung durch Hypoxie, Glutamat oder UV-Bestrahlung reduzieren kann. Ein optimaler neuroprotektiver Effekt wurde bei Applikation des rEpos vier bis acht Stunden vor, aber auch noch bis zu sechs Stunden nach der Zellschädigung erzielt. Um den neuroprotektiven Effekt zu erreichen, war schon eine 5-minütige Behandlungen mit rEpo 24 h vor der Schädigung ausreichend [6, 7, 8, 9].

In Ischämie-Modellen konnte gezeigt werden, dass rEpo *in vivo* sowohl das morphologische Ausmaß des Gewebeschadens begrenzt als auch die funktionelle Integrität der betroffenen Hirnareale positiv beeinflusst. So konnten Letalschäden der hippocampalen CA1-Neuronen verhindert, eine Lernbehinderung begrenzt sowie neuronale Funktionen erhalten werden [7, 10]. In einem Maus-Schlaganfall-Modell fand sich unter Epo-Gabe 24 h vor bzw. bis zu 3 h nach Schädigung eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens und der assoziierten Entzündungsreaktion [9]. Außerdem begünstigte rEpo das Überleben septaler cholinergischer Neurone in adulten Ratten nach einer Fimbria-Fornix Transsektion [11]. Bei Kaninchen mit induzierter Subarachnoidal-Blutung war rEpo ebenfalls neuroprotektiv [12].

In den letzten Jahren publizierte Arbeiten weisen auch eine kardioprotektive Wirkung von rEpo unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen nach (zusammengefasst in [13, 14]).

Obwohl die neuroprotektiven Funktionen des Epo durch zahlreiche Untersuchungen fundiert sind, war die Bedeutung des Epo/EpoR-Systems für die normale Entwicklung des ZNS lange umstritten. Während Suzuki *et al.* berichten, dass die nicht-hämatopoietische *EpoR*-Expression für die Entwicklung entbehrlich ist [15], zeigen andere Gruppen, dass der *EpoR*-Signalweg zur normalen Gehirnentwicklung nötig ist [16] und für die Neurogenese relevant ist [17].

1.2 Der Erythropoietin-Rezeptor (EpoR)

1.2.1 Struktur und Aktivierung des EpoR

Epo vermittelt seine zellproliferativen und zellprotektiven Effekte über die Bindung an den Epo-Rezeptor (EpoR).

Der EpoR, schematisch dargestellt in Abbildung 1, besteht aus einer extrazellulären, einer Transmembran- sowie einer cytoplasmatischen Domäne [18] und gehört zu der Superfamilie der Cytokinrezeptoren, die durch homologe Regionen in der extrazellulären Domäne charakterisiert werden. Dazu gehören vier konservierte Cysteine und ein WSXWS-Motiv [Tryptophan-Serin-X (= beliebige Aminosäure)-Tryptophan-Serin] [19, 20]. In der cytoplasmatischen Domäne befinden sich zwei weitere konservierte Motive (Box 1 und Box 2) [19]. Zur Superfamilie der Cytokinrezeptoren zählen unter anderen die Rezeptoren für G-CSF (*Granulocyte colony stimulating factor*), GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), Thrombopoietin, einige Interleukine (z.B. IL-2, -3, -4, -5, -6, -11, -15), Wachstumshormon, Prolactin und Leptin [19, 21, 22, 23, 24].

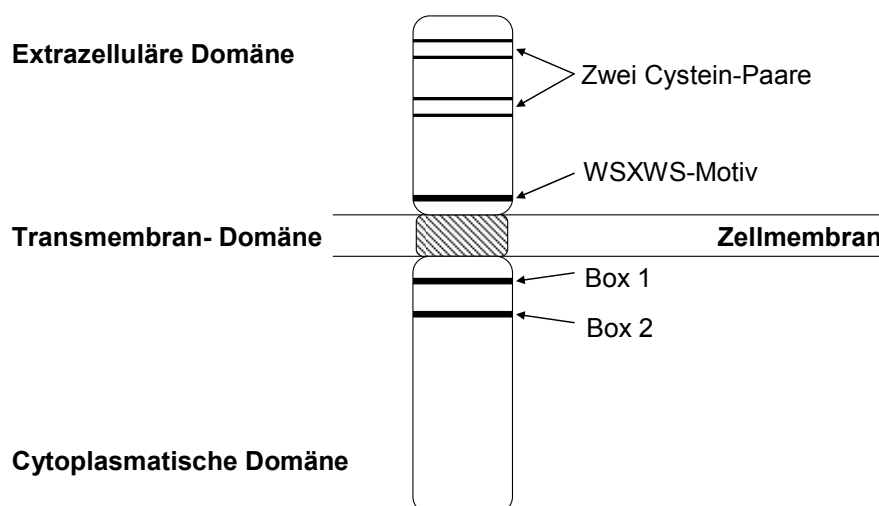


Abbildung 1. Struktur des EpoR. In der extrazellulären sowie in der cytoplasmatischen Domäne sind konservierte Motive hervorgehoben, die für die Mitglieder der Cytokinrezeptor-Familie charakteristisch sind.

Epo bindet an zwei EpoR-Moleküle, was zu deren Dimerisierung führt (Abbildung 2). So wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, wobei es zu einer schnellen Tyrosinphosphorylierung von verschiedenen mit dem EpoR assoziierten Proteinen kommt. Die dominierende Kinase in diesem Prozess ist die Janus-Kinase 2 (JAK2), die konstitutiv mit der cytoplasmatischen Domäne des EpoR assoziiert ist. Die EpoR-Dimerisierung bringt zwei JAK2-Moleküle in unmittelbare Nähe zueinander, wodurch es zur Transphosphorylierung der Kinasen sowie zur Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste in der cytoplasmatischen Domäne des EpoR kommt [25]. Die phosphorylierten Tyrosinreste des EpoR dienen als Bindungsstellen für unterschiedliche intrazelluläre Proteine, wie SHP1, SHP2 (*SH-2 domain-containing proteins*) und STAT-5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), die von JAK2 phosphoryliert werden, was wiederum die weitere Signaltransduktion aktiviert [26]. Mechanismen der negativen Rückkopplung führen zur Dephosphorylierung des EpoR und der JAK2 und beenden die Signalkaskade [27].

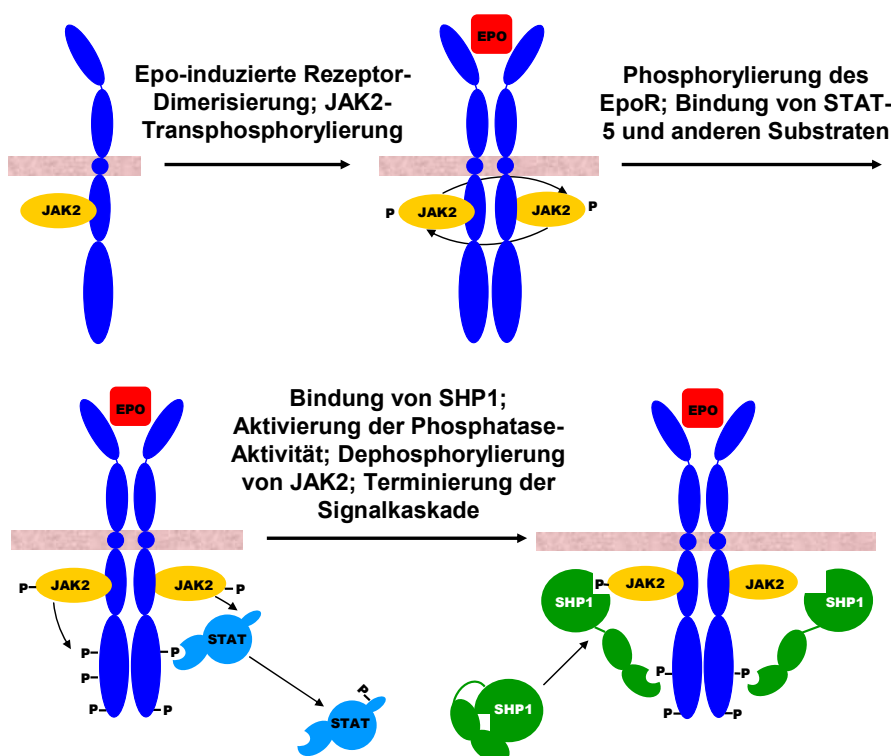


Abbildung 2. Epo-induzierter Signalweg, der unter anderem das hier gezeigte JAK2/STAT-System beinhaltet. Die Abbildung wurde aus Constantinescu *et al.* [20] übernommen und modifiziert.

Andere Mitglieder der Cytokinrezeptor-Familie können mit dem EpoR interagieren, was möglicherweise für die gewebespezifische Aktivierung und Funktion relevant ist. In erythroiden Progenitorzellen wird der EpoR beispielsweise durch die Tyrosinkinase-Aktivität des aktivierten Stammzell-Faktor-Rezeptors phosphoryliert [28]. Außerdem interagiert die β -Kette (β cR, *common β receptor*) der IL-3 und GM-CSF Rezeptoren funktionell und physikalisch mit dem EpoR, was in der Erythropoiese zu einem synergistischen Effekt dieser Faktoren mit dem Epo führt [29]. Es wurde gezeigt, dass Epo die β -Ketten beider Rezeptoren durch Epo-spezifische Signalwege aktiviert [30, 31]. Ferner vermittelt Epo in neuronalen Zellen seinen gewebesetzenden Effekt durch die Bindung an einen Heterorezeptor aus dem EpoR und β cR [32].

1.2.2 EpoR-Expression

Der EpoR wird gewebespezifisch und entwicklungsabhängig exprimiert. Der früheste Linien-spezifische Zelltyp in der Erythropoiese, die BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*), hat nur eine relativ kleine Anzahl von EpoR auf ihrer Oberfläche. Die Zahl der Epo-Rezeptoren nimmt mit fortschreitender Differenzierung zur CFU-E (*colony-forming unit-erythroid*) zu [33]. EpoR wird auch in hämatopoietischen Stammzellen [34], in Stromazellen der Leber [35], in Megakaryozyten [36], in der humanen fetalen und adulten Niere [3, 37] sowie in der humanen fetalen Nebenniere exprimiert [3]. Außerdem wird der EpoR im humanen und murinen fetalen und neonatalen Gastrointestinaltrakt [3, 38], in humanen und murinen Endothelzellen [36], in der sich entwickelnden humanen Lunge [3], im Auge von humanen Feten [39] und neonatalen Ratten [40], sowie in weiblichen und männlichen Reproduktionsorganen verschiedener Spezies exprimiert [41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48]. Primäre Satellitenzellen aus der Basalmembran des adulten Skelettmuskels von Mäusen exprimieren ebenfalls den EpoR [49]. Im embryonalen Herz der Maus zeigt sich ein zelltypspezifisches und temporales EpoR-Expressionsmuster. *EpoR*-mRNA, nachgewiesen mittels *in situ*-Hybridisierung, wird zwischen den Entwicklungsstadien E10,5 und E13,5 im Endokard, Epikard, Perikard, nicht aber im Myokard exprimiert [50]. Allerdings wurde eine immunhistologische Färbung des EpoR-Proteins im embryonalen Myokard der Maus am Entwicklungstag E11,5

gezeigt [16]. Im humanen fetalen Myokard fand sich eine schwache EpoR-Immunreaktivität in einem Gestationsalter von fünf Wochen pc und eine ausgeprägte EpoR-Färbung mit 8-18 Wochen pc [3].

Der EpoR wird im embryonalen, fetalen und adulten ZNS von Ratte, Maus, Affe und Mensch exprimiert [6, 39, 51, 52, 53, 54]. Im humanen ZNS fand sich in immunhistologischen Untersuchungen ein entwicklungsabhängiges und zellspezifisches Expressionsmuster des EpoR. Im embryonalen ZNS mit einem Gestationsalter von fünf bis sechs Wochen pc wurde EpoR-Protein periventrikulär in undifferenzierten Neuroepithelzellen der germinalen Matrix gezeigt [39, 55]. Im Gestationsalter von zehn Wochen pc wurde der EpoR insbesondere in der Subventrikularzone, im Neuropil und in der Kortikalplatte detektiert, während in der Ventrikular- und Matrixzone nur eine geringe EpoR-Expression gezeigt wurde. In diesem Entwicklungsstadium ließ sich nur eine schwache bzw. keine Immunreaktivität im Hippocampus und im Nucleus caudatus nachweisen. Während zu Beginn der Entwicklung eine eher diffuse EpoR-Färbung in breiten Zonen des sich entwickelnden Neocortex gefunden wurde, stellte sie sich spezifischer in zunehmend differenzierten Neuronen dar. EpoR-Expression wurde ferner in Subpopulationen von Astrozyten in der Nähe von Gehirnkapillaren gezeigt [9, 39]. Im humanen adulten Gehirn wurde die *EpoR* mRNA-Expression und EpoR-Proteinexpression im Hippocampus, in der Amygdala (Mandelkern) und im temporalen Cortex beschrieben [52, 55].

1.2.3 EpoR-Regulation

Die EpoR-Expression kann auf transkriptioneller, posttranskriptioneller und posttranslationaler Ebene reguliert werden [56, 57, 58]. Mit Hilfe von Deletionsmutanten wurden in der 5'-flankierenden Region des *EpoR* verschiedene positiv oder negativ regulierende Domänen identifiziert. Der minimale Promotor des *EpoR*-Gens enthält als *cis*-Regulatorelemente weder eine TATA-Box, an die TFIID (Transkriptionsfaktor II D) als Teil des basalen Transkriptionsapparates bindet, noch ein CAAT-Motiv, das in vielen Promotoren eine wichtige Rolle spielt [59]. Dafür findet man stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle

sechs potentielle Bindungsstellen für GATA-Transkriptionsfaktoren (Abbildung 3).

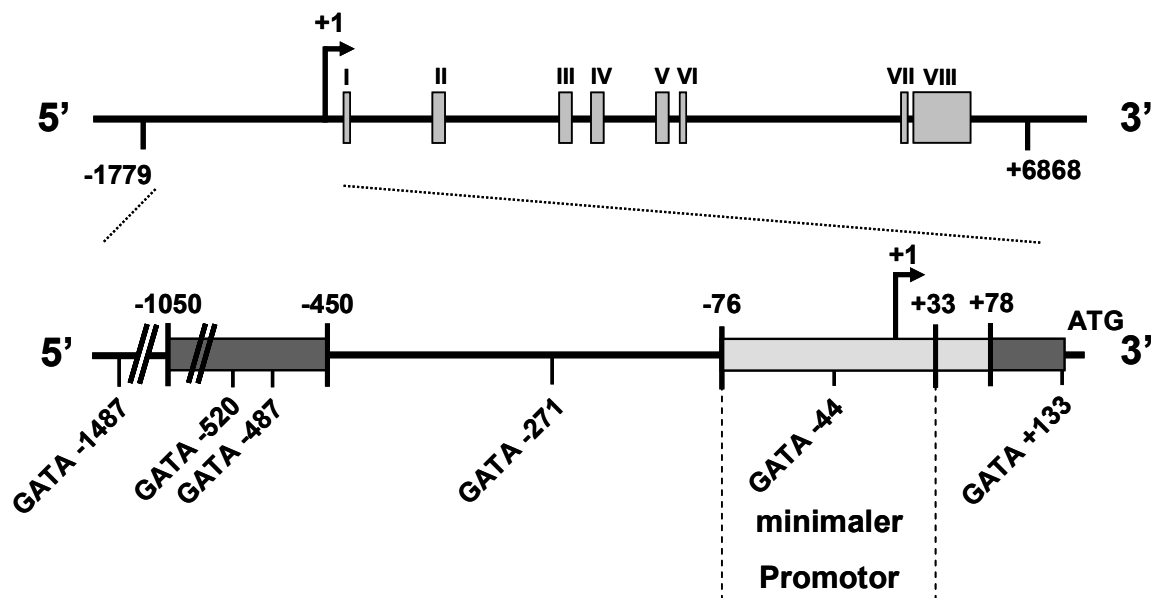


Abbildung 3. Genlocus des humanen *EpoR*. Im oberen Teil der Abbildung zeigen graue Boxen die acht Exons an. Die Transkriptionsstartstelle ist mit +1, die Translationsstartstelle mit ATG markiert. Im unteren Teil der Abbildung ist ein Ausschnitt aus der 5'-flankierenden Region vergrößert dargestellt. Der minimale Promotor sowie positiv (hellgraue Box) oder negativ (dunkelgraue Boxen) regulierende Domänen sind so wiedergegeben, wie sie in hämatopoietischen Zellen beschrieben wurden [59]. Potentielle Bindungsstellen für GATA-Transkriptionsfaktoren sind mit ihrer Position relativ zur Transkriptionsstartstelle markiert.

Bisherige Arbeiten beschränkten sich auf die Aktivierung der *EpoR*-Expression in hämatopoietischen Zellen, in denen eine Stimulation der *EpoR*-Expression durch Bindung von GATA-1 am minimalen Promotor gezeigt wurde [60, 61]. Bei dieser Regulation wurde ferner eine Kooperation von GATA-1 und Sp1 beschrieben [62]. Da die GATA-1 Expression auf hämatopoietische Zellen sowie Sertoli Zellen des Hodens beschränkt ist (zusammenfassend in [63]), stellt sich die Frage, ob andere Mitglieder aus der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der *EpoR*-Expression in neuronalen Zellen beteiligt sind.

1.3 GATA-Transkriptionsfaktoren

1.3.1 Struktur und Funktion der GATA-Transkriptionsfaktoren

GATA-Transkriptionsfaktoren sind in Vertebraten eine Gruppe von sechs Zinkfinger-Proteinen, die an die (T/A)GATA(G/A) Konsensus-Sequenz binden und eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Zellen spielen [64]. Die GATA-Konsensussequenz wurde zuerst in der Analyse der Hämoglobingene als ein *cis*-Regulator-element definiert [65, 66, 67, 68]. Es zeigte sich aber, dass die GATA-Transkriptionsfaktoren sowohl bei der Regulation von anderen Genen in erythroiden Zellen [60, 61, 69] als auch von Genen, die in nicht-hämatopoietischen Zellen exprimiert werden [70], eine wichtige Rolle spielen. GATA-Bindungsstellen befinden sich ferner in regulatorischen Sequenzen ihrer eigenen Gene. So agiert GATA-1 am eigenen Promotor als Aktivator [71]. GATA-2 kontrolliert während der Differenzierung und Proliferation der hämatopoietischen Progenitorzellen die Expression von GATA-1 und umgekehrt [72]. In neuronalen Geweben von GATA-2^{-/-} Mäusen findet sich eine reduzierte GATA-3 Expression [73]. Auch für GATA-4 und -6 wurde eine gegenseitige Regulation beschrieben. So ist GATA-6 im Dottersack von GATA-4^{-/-} Embryonen heraufreguliert [74, 75], während GATA-4 in GATA-6^{-/-} Embryonen stark eingeschränkt exprimiert wird [76].

Die GATA-Bindungsproteine enthalten zwei Zinkfinger, wobei der Amino-terminale Finger nur zur vollen Spezifität und Stabilität der DNA-Bindung nötig ist, während der Carboxy-terminale Finger für die Bindung erforderlich ist [77]. Die Zinkfinger-Domänen sind in verschiedenen Spezies stark konserviert, variieren aber dennoch in ausgewählten Aminosäuren [78]. Als Beispiel für die Zinkfinger-Formation ist in Abbildung 4 ein Abschnitt der Aminosäuresequenz des humanen GATA-3 gezeigt.

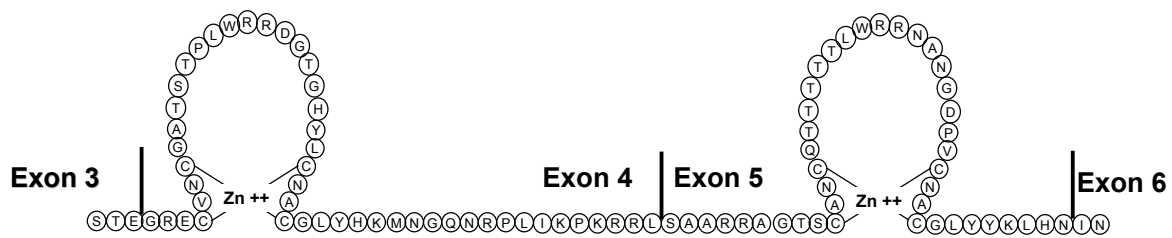


Abbildung 4. Abschnitt der Aminosäuresequenz des humanen GATA-3. Die zwei Zinkfingerdomänen werden jeweils aus einem Komplex von vier Cysteinresten und einem Zn^{2+} -Molekül gebildet. Die Exon-Übergänge auf der cDNA-Ebene sind in der Aminosäurenabfolge gekennzeichnet.

Die GATA-Faktoren wurden ursprünglich nach ihren Expressionsmustern in zwei Gruppen aufgeteilt, wonach GATA-1, -2 und -3 vor allem in hämatopoietischen Zellen vorkommen und Gene in erythroiden Zellen, Megakaryozyten und T-Lymphozyten regulieren (zusammenfassend in [79]), während GATA-4, -5 und -6 in verschiedenen vom Meso- und Endoderm abstammenden Geweben wie Herz, Leber, Lunge, Gonaden und Darm exprimiert werden [79, 80, 81, 82, 83, 84]. Spätere Untersuchungen zeigten, dass die GATA-Faktoren abweichend von dieser Einteilung auch in anderen Gewebetypen exprimiert werden. So konnten z.B. GATA-2, -3, -4 und -6 im ZNS nachgewiesen werden [73, 85, 86, 87].

1.3.2 GATA-Transkriptionsfaktoren im zentralen Nervensystem

GATA-2, -3, -4 und -6 werden in unterschiedlichen Arealen des ZNS exprimiert, während GATA-1 und GATA-5 nicht im ZNS vorkommen.

Transgene Mäuse mit einer homozygoten *GATA-2* Deletion (*GATA-2*^{-/-}) sterben um den Tag E10,5 bis E11,5 der Gestation aufgrund einer ausbleibenden 'definitiven' Hämatopoiese [88]. Diese Embryonen weisen auch einen schwerwiegenden Defekt in der Neurogenese auf [85]. Ein spezifisches und entwicklungsabhängiges Expressionsmuster von GATA-2 konnte in neuronalen Zelltypen gezeigt werden. Im Rautenhirn von Mausembryonen wird *GATA-2* mRNA im Entwicklungsstadium E9 im Rhombomer 4 und temporär im Rhombomer 2

exprimiert [73, 85]. Zwischen den Tagen E9,5 und E11,5 ist *GATA-2* in verschiedenen Bereichen mit neuronaler Differenzierung aktiv, z.B. im Bulbus olfactorius, im Mittelhirn (Praetectum und Kerngebiet des N. oculomotorius), in der Bodenplatte sowie in Moto- und V2 Interneuronen des Rückenmarks [85, 89]. *GATA-2* ist ebenfalls für die Entwicklung serotonerger Neurone relevant [90].

GATA-3^{-/-} Mäuse sterben um den Entwicklungstag E11 aufgrund eines Noradrenalin-Mangels im sympathischen Nervensystem [91]. *GATA-3* mRNA wird in Progenitorzellen der Motoneurone des Rhombomers 4 am Entwicklungstag E9, im lateralen Teil des ventralen Neuralrohrs, im Mesenzephalon und im Rückenmark am Tag E10,5 sowie zusätzlich im Di-enzephalon am Tag E11,5 und E14,5 exprimiert [73, 85, 92]. *GATA-3* wird ebenfalls in Zellen des vestibulo-cochlearen Systems detektiert [93]. Außerdem ist *GATA-3* essentiell für die normale Entwicklung serotonerger Neurone der Raphe-Kerne [94].

Transgene Mäuse mit einer homozygoten *GATA-4* Deletion sterben zwischen den Entwicklungstagen E7 und E9,5 aufgrund einer gestörten Vaskulogenese des Dottersackes und Entwicklung des Herzens [75]. *GATA-4* wird während der Entwicklung in migrierenden Neuronen, die das Gonadotropin-freisetzende Hormon (*Gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) sezernieren, aber nicht in reifen GnRH-sezernierenden Neuronen detektiert [86].

GATA-6^{-/-} Mäuse sterben früh in der Entwicklung (Tag E5,5-E7,5) aufgrund einer gestörten Vaskulogenese und Inhibition der Differenzierung des Ektoderms, Neuroektoderms und viszerale Endoderms [76, 95]. *GATA-6* wird im Neuralrohr am Entwicklungstag E7,5 und später (E11,5-E14,5) in unterschiedlichen Bereichen des ZNS (u.a. Cortex) exprimiert [87].

Das Vorhandensein von multiplen Bindungsstellen für GATA-Transkriptionsfaktoren in der 5'-regulierenden Region des *EpoR*-Gens und die Expression von *GATA-2*, -3, -4 und -6 in neuronalen Zellen erlauben die Hypothese, dass GATA-Faktoren an der *EpoR*-Regulation in neuronalen Zellen beteiligt sind.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Tatsache, dass verschiedene GATA-Transkriptionsfaktoren als gewebespezifische Regulatoren des *Epo* agieren [96, 97, 98] und dass GATA-1 als ein Regulator des *EpoR* in hämatopoietischen Zellen identifiziert wurde [60, 61], führten zu unserer Hypothese, dass die Expression des *EpoR* im ZNS bzw. in neuronalen Zellen durch GATA-Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Diese Faktoren könnten je nach Bindungsstelle oder Affinität positive oder negative Effekte auf die Expression des *EpoR* haben. Ihre Wirkung könnte auch je nach Zelltyp sowie Reifungs- bzw. Differenzierungsgrad variieren.

Ziel der Promotionsarbeit war es, die Regulationsmechanismen der neuronenspezifischen Expression des *EpoR* aufzudecken. Dabei sollte insbesondere die Bedeutung der GATA-Transkriptionsfaktoren aufgeklärt werden, für die potenzielle Bindungsstellen in der 5'-flankierenden Region des *EpoR*-Gens vorhanden sind.

Die Arbeit sollte folgende Untersuchungen beinhalten: Expressionsanalysen des Zielgens und der potentiellen Regulatoren im ZNS der sich entwickelnden Maus und in humanen fetalen Gewebeproben des Nervensystems; DNA-Protein-Bindungsstudien *in vitro* (Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA) und *in vivo* (Chromatin-Immunpräzipitations-Assay; ChIP-Assay); Promotorstudien mittels Reportergen-Assays; funktionelle Untersuchungen (transiente und stabile Überexpression sowie RNA-Interferenz der potentiellen Regulatoren).

2 MATERIAL

2.1 Material und Hersteller

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1. Chemikalien.

Produkt	Hersteller
40% Acrylamide/Bis Solution 19:1	Bio-Rad Laboratories
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen
Ammoniumacetat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
ATP gamma ³² P	ICN
Bacto™ Technischer Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson
β-Mercaptoethanol	Sigma
Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye Solution	Sigma
Chloroform	J. T. Baker
Complete und Complete Mini Protease-Inhibitoren-Cocktail (Tabletten)	Roche Diagnostics
D(+)-Glukose	Merck
Distilled Water DNase, RNase Free	Invitrogen
dNTP Set (100 mM)	Invitrogen

DMSO	Sigma
DTT	Sigma
DTT (0,1 M)	Invitrogen
ECL Detection Reagents	Amersham Biosciences
EDTA	Invitrogen
Eisessig	Merck
Ethanol	J. T. Baker
Ethanol 100% v/v denaturiert mit Ethylmethylketon	Herbeta-Arzneimittel
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ficoll	Sigma
Formaldehyd, mindestens 37%	Merck
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics
Geneticin ® Selective Antibiotic	Invitrogen
Glycerin	Merck
Glycin	Serva
Glycogen	Invitrogen
Hepes	Sigma
Herring Sperm DNA (10 mg/ml)	Promega
Igepal CA-630	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	neoLab Migge Laborbedarf
Kanamycin monosulfate	Sigma
KCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Sigma

Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG
Mausserum	Jackson ImmunoResearch Laboratories
MgCl ₂	Sigma
MgSO ₄ (1 M)	Sigma
NaCl	Merck
Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O	Sigma
NaOH (5 N)	Merck
Natriumacetat	Sigma
Natrium-Deoxycholat	Acros Organics
NeoRecormon (1000 U/ml)	Roche
Oligo(dT) ₁₅ Primer (0,5 µg/µl)	Promega
Paraformaldehyd	Merck
PEG 6000	Roth
Phenol:Chloroform (5:1)	Sigma
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma
PMSF	Sigma
Poly[d(I-C)]	Roche
Protein Assay Reagent	Bio-Rad Laboratories
Purified BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs
RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	Promega
Saccharose	Merck
SDS	Sigma
Technischer Agar	Becton Dickinson
Temed	Merck

Tissue-Tek O.T.C.	Sakura Finetek Europe
Tris	Roth
Tris Hydrochlorid	Roth
Triton X-100	Sigma
Trizol® Reagent	Invitrogen
Tween®20	Sigma
Vectashield Mounting Medium H-1200 mit DAPI	Vector Laboratories
XL10-Gold β-Mercaptoethanol (β-ME) Mix	Stratagene

2.1.2 Enzyme

Tabelle 2. Enzyme.

Produkt	Hersteller
CIAP (1 U/μl)	Invitrogen
GoTaq™ DNA Polymerase (5 U/μl)	Promega
<i>Hind</i> III (20 U/μl)	New England BioLabs
Lysozym	Sigma
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen
RNase A (100 mg/ml)	Qiagen
T4 DNA Ligase (1 U/μl)	Invitrogen
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	New England BioLabs
<i>Xba</i> I (20 U/μl)	New England BioLabs
<i>Xho</i> I (20 U/μl)	New England BioLabs

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3. Enzympuffer.

Produkt	Hersteller
5x DNA Ligase Buffer	Invitrogen
5x First-Strand Buffer	Invitrogen
5x Green GoTaq™ Buffer	Promega
10x NEBuffer 2	New England BioLabs
10x T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer	New England BioLabs

Tabelle 4. Pufferzusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
Alkalischer SDS Puffer	0,2 M NaOH; 1% w/v SDS
Bindungs-puffer	10 mM TrisHCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 75 mM KCl; 4% w/v Ficoll; kurz vor Gebrauch plus 2 mM DTT; 0,2 mM PMSF
Blocking-puffer	1x PBS; 1% v/v Mausserum; 0,1% v/v Triton X-100
Dialyse-puffer	20 mM Hepes pH 7,8; 20% v/v Glycerin; 100 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; kurz vor Gebrauch plus 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 3 Complete Tabletten (Protease-Inhibitoren-Cocktail)/1 l Puffer
GTE-Puffer	50 mM Glukose; 25 mM TrisHCl pH 8,0; 10 mM EDTA
1x Lade-puffer	0,002% w/v Bromphenol Blue-Xylene Cyanole; 5% v/v Glycerin
1x Lauf-puffer	25 mM Tris pH 8,6; 192 mM Glycin; 0,1% w/v SDS

Lysepuffer	20 mM Hepes pH 7,6; 10 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; 0,1% v/v Triton X-100; 20% v/v Glycerin; kurz vor Gebrauch plus 1 mM DTT; 1 mM PMSF; ½ Complete Mini Tablette (Protease-Inhibitoren-Cocktail)/10 ml Puffer
NE-Puffer	20 mM Hepes pH 7,6; 400 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; 20% v/v Glycerin; kurz vor Gebrauch plus 1 mM DTT; 1 mM PMSF; ½ Complete Mini Tablette (Protease-Inhibitoren-Cocktail)/10 ml Puffer
1x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,2 K ₂ HPO ₄ ; pH 7,3
1x Proben-puffer	62,5 mM Tris pH 6,8; 2% w/v SDS; 25 % v/v Glycerin; 0,01% w/v Bromphenol Blue-Xylene Cyanole; 100 mM DTT
RIPA-Puffer	50 mM TrisHCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% v/v Igepal CA-630; 0,25% w/v Natrium Deoxycholat; 0,1% w/v SDS; kurz vor Gebrauch plus Complete Protease Inhibitoren; 1 mM PMSF
1x TAE	40 mM Tris; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 8,0
1x TBE	89 mM Tris pH 8,3; 2,5 mM EDTA; 89 mM Borsäure
1x TBS	30 mM TrisHCl pH 7,6; 150 mM NaCl
TBST	1x TBS; 0,1 % v/v Tween®20
TE-Puffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4 oder 8,0
1x Transfer-puffer	25 Tris; 200 mM Glycin; 20% v/v Ethanol

2.1.4 Kommerzielle Assay-Systeme

Tabelle 5. Kommerzielle Assay-Systeme.

Produkt	Hersteller
Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay	Upstate
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Luciferase Assay System	Promega

QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

2.1.5 DNA- und Protein-Marker

Tabelle 6. DNA- und Protein-Marker.

Produkt	Hersteller
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories

2.2 Bakterien, Zelllinien, Tiere

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung von Plasmid-DNA wurden SoloPack® Gold Supercompetent Cells (Stratagene) mit dem folgenden Genotyp verwendet: Tet^r $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r].

2.2.1.2 Nährmedien für Bakterienstämme

Tabelle 7. Nährmedien für Bakterienstämme.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	Für 1 l: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; pH 7,3
LB-Agar	1 l LB-Medium; 15 g Agar
S.O.C. Medium	2% w/v Trypton; 0,5 % w/v Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose

2.2.2 Humane Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 8. Humane Zelllinien.

Bezeichnung	Herkunft	Anbieter (Nummer)
HEK293	Embryonale Niere	ATCC (CRL-1573)
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC (CCL-2)
HepG2	Hepatoblastom	ATCC (HB-8065)
Kelly	Neuroblastom	DSMZ (ACC 355)
NT2	Teratokarzinom	Stratagene (204101)
SH-SY5Y	Neuroblastom	ATCC (CRL-2266)
SK-N-AS	Neuroblastom	ATCC (URL-2137)
U-2 OS	Osteosarkom	ATCC (HTB-96)
U-87 MG	Glioblastom	ATCC (HTB-14)

Tabelle 9. Nährmedien und Substrat-Lösungen für Zellkulturen.

Produkt	Hersteller
D-MEM + 4500 mg/l Glukose + L-Glutamin - Pyruvat	Invitrogen
DMEM/HAM's F-12 + L-Glutamin	Biochrom
FKS	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
MEM + Earle + L-Glutamin	Invitrogen
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/10.000 µg/ml)	Biochrom
RPMI-1640 + L-Glutamin	Invitrogen

2.2.3 Tiere

CD1 Swiss Webster Mäuse, ursprünglich von CRL Deutschland bezogen, wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Carmen Birchmeier (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) zur Verfügung gestellt. Das Studienprotokoll für die Untersuchung der Gewebeproben ist durch die dortige Ethikkommission geprüft und genehmigt worden.

2.3 Plasmide

2.3.1 Expressionsvektoren

Tabelle 10. Expressionsvektoren.

Plasmid	Charakteristika
pcDNA3.1(+) (Invitrogen)	Expressionsvektor, CMV-Promotor, Neomycin- und Ampicillinresistenz, 5428 bp
pN3	Expressionsvektor, CMV-Promotor, Kanamycinresistenz, 3996 bp, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Guntram Suske [99]
pN3-Sp1FL-complete	hSp1-Expressionsvektor, CMV-Promotor, Kanamycinresistenz, Sp1FL-complete in <i>Xho</i> I-Schnittstelle kloniert, 8175 bp, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Guntram Suske [99]
pRSV/neo+GATA-2	hGATA-2-Expressionsvektor, RSV-Promotor, Neomycin- und Ampicillinresistenz, hGATA-2 in <i>EcoR</i> I-Schnittstelle kloniert, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Constance T. Noguchi [100]
pSilencer/hGATA-4. ⁸⁵²⁻⁸⁷⁰	siRNA-Vektor gegen hGATA-4, Maus U6 Promotor, Ampicillinresistenz [98]
RSV/hGATA3	hGATA-3-Expressionsvektor, RSV-Promotor, Ampicillinresistenz, hGATA-3 in <i>Hind</i> III-Schnittstelle kloniert, 6265 bp, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. James D. Engel [101]

2.3.2 Reportergenvektoren

Tabelle 11. Reportergenvektoren.

Plasmid	Charakteristika
CMV/ β -Gal	β -Galaktosidasevektor, CMV-Promotor, Ampicillinresistenz, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Holger Scholz [102]
pGL2-Basic Vector (Promega)	Promotorloser <i>Firefly</i> Luziferasevektor für Promotorstudien, Ampicillinresistenz, 5598 bp
phRL-TK Vector (Promega)	Vektor mit synthetischer <i>Renilla</i> Luziferase (hRluc), HSV-TK-Promotor, Ampicillinresistenz, 4045 bp
pSV- β -Galactosidase Control Vector (Promega)	β -Galaktosidasevektor, SV40-Promotor, Ampicillinresistenz, 6820 bp

2.4 Oligonukleotide

Alle Primer und Oligonukleotide, mit Ausnahme der Real-time PCR-Primer und der siRNA, wurden von Invitrogen oder TIB MOLBIOL synthetisiert.

2.4.1 Primer für RT-PCR

Folgende Primersequenzen wurden aus der Literatur übernommen: *β -Aktin* (Invitrogen Cat.No. 10929-016), *GATA-1*, -2 und -3 [103], *GATA-4* (1. Rückwärts), -5 und -6 [104], *GATA-4* (Vorwärts) [98], *HNF-3 α* [105], *HNF-3 β* [106], *Ets-2* [107], *STAT5A* und *STAT5B* [108]. Folgende Primersequenzen wurden aus der Literatur übernommen und modifiziert: *Smad3* [109], *YY1* [110], *STAT6* [111], *TBP* [112]. Die Primer für *EpoR* und *Sp1* wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Holger Scholz zur Verfügung gestellt (nicht veröffentlicht).

Tabelle 12. Primer für die RT-PCR. Die Annealing-Temperatur (T_A) ist in °C angegeben.

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')	T_A	Produktgröße
<i>β-Aktin</i>	gctcgtcgtcgacaacggctc	caaacatgatctgggtcatcttctc	60	353 bp
<i>Epo</i>	cagctgcatgtggataaagc	ctggagtgtccatgggacag	65	360 bp
<i>EpoR</i>	accgtgtcatccacatcaat	gccttcaaactcgtctctg	60	485 bp
<i>Ets-2</i>	gtggacctattcagctgtgg	ttccccgacgtcttgtggat	58	228 bp
<i>GAPDH</i>	aaggtcatccatgacaactt	ttcagctcaggatgacctt	60	191 bp
<i>GATA-1</i>	gatcctgctctggtgtctcc	acagttgagcaatgggtacacc	65	192 bp
<i>GATA-2</i>	ccctaagcagcgcagcaagac	gatgagtggctcggttctggcc	60	164 bp
<i>GATA-3</i>	gtacagctccgactcttccc	ctgctctcctggctgcagaca	60	257 bp
<i>GATA-4</i>	ctccttcaggcagtgagagcc	ggtcctgcaggaatttgagg oder gattatgtccccgtgactgt	60	368 bp oder 303 bp
<i>GATA-5</i>	tcgccagcactgacagctcag	tggtctgttccaggctgttcc	65	290 bp
<i>GATA-6</i>	ttctaactcagatgattgcag	gctgcacaaaagcagacacga	60	300 bp
<i>HNF-3α</i>	cagcaaacaaaaccacacaaa	taaataaacctccacaaacta	58	288 bp
<i>HNF-3β</i>	aagatggaagggcacgagc	tgtacgtgttcattgccgttca	58	114 bp
<i>Smad3</i>	accatccccagggtccctgg	aactcggccgggatctctg	58	253 bp
<i>Sp1</i>	tgatcatggagctcagcttg	ttgccatacactttcccaca	58	240 bp
<i>STAT5A</i>	gccggctgtgtatggtctat	Aagtagtgccggacctcgat	58	283 bp
<i>STAT5B</i>	gtaaaccatggctgtgtgga	aaataatgccgcacctcaat	58	107 bp
<i>STAT6</i>	gcagttcaacaaggagatcc	ttccacggctcatcttgatgg	58	454 bp
<i>TBP</i>	cgtgtgaagataaccaagg	atcattggactaaagataggga	58	226 bp
<i>YY1</i>	gaaaacatctgcacaccacg	gtcctcctgttgggaccac	58	569 bp

2.4.2 Oligonukleotide für den Electrophoretic Mobility Shift Assay

Tabelle 13. Oligonukleotide für EMSA. Nur der *sense*-Strang ist aufgeführt. Die Bezeichnung der Oligonukleotide bezieht sich auf ihre Lage relativ zur Transkriptionsstartstelle. Die GATA-Bindungsstellen sind unterstrichen. Mutierte Nukleotide sind in Rot wiedergegeben.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
-1504/-1475	gtgcagtggccaaat <u>atc</u> ggctcactgaaa
-1504/-1475m	gtgcagtggccaaa <u>aaa</u> aggctcactgaaa
-538/-509	aggtgcagtgggaag <u>attg</u> cttcagtccag
-538/-509m	aggtgcagtgggaa <u>aaaa</u> cttcagtccag
-501/-472	agtgagctat <u>gattg</u> gccactgcactcca
-286/-257	gctgatttctgc <u>gata</u> aaaatcagtaggtac
-286/-257m	gctgatttctgc <u>aaaa</u> aaaatcagtaggtac
-54/-25	aggcactt <u>atct</u> taccaggctgagtgct
-54/-25m2	aggcact <u>ccc</u> tctaccaggctgagtgct
+120/+149	gtggcgggggctg <u>tatc</u> atggaccacctcg
+120/+149m	gtggcgggggctg <u>aaa</u> aatggaccacctcg

2.4.3 Primer zur Klonierung der Expressionsvektoren

Tabelle 14. Primer zur Klonierung der Expressionsvektoren. „+“ und „-“ bezeichnen den Vorwärts- bzw. den Rückwärtsprimer. Die spezifischen cDNA-Sequenzen sind in Großbuchstaben, das Startcodon ATG und das Stopcodon in fett markierten Buchstaben wiedergegeben. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Die Kozak-Sequenz wurde jeweils auf GCCGCCGGCCATGG ergänzt [113].

Primer	Sequenz 5'-3'	Restriktions- enzym
IP15+	tataa <u>agctt</u> GCCGCCGGCCATGGAGGTGG	<i>Hind</i> III
IP16-	tata <u>ctcgag</u> CTAGCCCATGGCGGTCACC	<i>Xho</i> I
IP17+neu2	tata <u>ctcgagg</u> ccgccGCCATGGAGGTGACGGCGG	<i>Xho</i> I
IP18-neu	tata <u>tctaga</u> CTAACCCATGGCGGTGAC	<i>Xba</i> I
IP19+	tataa <u>agctt</u> gccgccACCATGTATCAGAGCTTGGCC	<i>Hind</i> III
IP20-	tata <u>ctcgag</u> TTACGCAGTGATTATGTCCCCG	<i>Xho</i> I

2.4.4 Primer zur Klonierung und Mutagenese der Reporter-gen-Konstrukte

Tabelle 15. Primer zur Klonierung der pGL2-Basic Reporter-gen-Konstrukte für die 5'-flankierende Region des *EpoR*-Gens aus genomischer DNA bzw. aus bereits klonierten Konstrukten sowie Primer zur Mutagenese der Reporter-gen-Konstrukte mittels OE-PCR. „+“ und „-“ bezeichnen den Vorwärts- bzw. den Rückwärtsprimer. Die spezifischen *EpoR* cDNA-Sequenzen sind in Großbuchstaben wiedergegeben, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Mutierte Nukleotide sind in Rot wiedergegeben. Für die Amplifizierung aus bereits klonierten Konstrukten wurden auch Primer verwendet, die im pGL2-Basic Vektor binden (GLprimer1 und IP31-).

Primer	Sequenz 5'-3'	Restriktionsenzyme
GATA-54mF2	AGGCACTCCCTCTACCCAGGCTGAGTGCT	nicht vorhanden
GATA-54mR2	AGCACTCAGCCTGGGTAGAGGGGAGTGCCT	nicht vorhanden
GATA-286mF	GCTGATTTCTGCAAAAAATCAGTAGGTAC	nicht vorhanden
GATA-286mR	GTACCTACTGATTTTTTTGCAGAAATCAGC	nicht vorhanden
GLprimer1	tgtatcttatggtactgtaactg	nicht vorhanden
IP1+	tatactcgagCTGAGACAGAGAGAGAGAG	<i>Xho</i> I
IP2-	tataaagcttCAAAAAATGTACCTACTG	<i>Hind</i> III
IP3+	tatactcgagGGGCCCCTGCCTCCTCCC	<i>Xho</i> I
IP4-	tataaagcttGACCAGGCCCTTCCCGACC	<i>Hind</i> III
IP4-mut	tataaagcttGACCAGGCCCTTAAAGACC	<i>Hind</i> III
IP13+	tatactcgagCGCCTGGGCGCCCCCG	<i>Xho</i> I
IP14-	tataaagcttTCCTAACATACCCACCCCG	<i>Hind</i> III
IP31-	tgcattctgtaaaagcaattgtcc	nicht vorhanden
IP33-	tataaagcttACCTTACCTGAGCTTCAGAC	<i>Hind</i> III
IP34-mut	GACCAGGCCCTTAAAGACCAGGCGCCT C	nicht vorhanden
IP35+mut	GAGGCGCCTGGTCTTTAAGGGCCTGGTC	nicht vorhanden

IP37-	tataaagcttATTATTTTCTCTCTCTCTCTC	<i>Hind</i> III
IP38-	tataaagcttTGGAAATAAATAAAAATTATTTTC	<i>Hind</i> III
IP39-mut	GCATCTCTTCCC TTTT TGGAAATAAATA	nicht vorhanden
IP40+mut	TATTTATTTC CAAAA GGGAAGAGATGC	nicht vorhanden
IP41-mut	CAGATCCCCGAG TTTT CGGGGCCAGCAC	nicht vorhanden
IP42+mut	GTGCTGGCCCCG AAAA CTCGGGGATCTG	nicht vorhanden

2.4.5 TaqMan® Gene Expression Assays

Tabelle 16. Humane TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystems.

Gen	Assay ID
Actin, beta	Hs99999903_m
Erythropoietin receptor	Hs00181092_m1
GATA binding protein 2	Hs00231119_m1
GATA binding protein 3	Hs00231122_m1
GATA binding protein 4	Hs00171403_m1

2.4.6 Silencer® Pre-Designed siRNA

Tabelle 17. *Silencer*® Pre-designed siRNA von Ambion.

Gen	siRNA ID #
<i>GATA-2</i>	145419

<i>GATA-3</i>	43336
<i>Silencer</i> ® Negative Control #1 siRNA	-

2.4.7 Primer für den Chromatin-Immunpräzipitations-Assay

Tabelle 18. Primer für den ChIP-Assay. Die Annealing-Temperatur (T_A) ist in °C angegeben.

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')	T_A	Produktgröße
<i>EpoR</i>	ctgggaagagatgctgatttc	cgcctctaagtggcagatcc	60	289 bp
<i>GAPDH</i> [98]	acgtagctcaggcctcaagacctt	gccgcatacgtcctccgcccgcc	60	321 bp

2.5 Antikörper

Tabelle 19. Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L) (2 µg/µl)	MoBiTec
Anti-acetyl-Histone H4 rabbit polyclonal IgG (1 µg/µl)	Upstate
Anti-AP-2 α clone 8G8/5 mouse monoclonal IgG (1 µg/µl)	Upstate
Anti-mouse Epo R goat polyclonal IgG (0,1 µg/µl)	R&D Systems
Anti-STAT1 rabbit polyclonal IgG (1 µg/µl)	Upstate
Cy TM 3-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ fragment donkey anti-rabbit IgG (H+L) (0,75 µg/µl)	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Epo (N-19) goat polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz

EpoR (C-20) rabbit polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz
EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz
Ets-1/Ets-2 (C-275) X rabbit polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz
GATA-2 (C-20) goat polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz
GATA-2 (CG2-96) bzw. X mouse monoclonal IgG (0,2 bzw. 2 µg/µl)	Santa Cruz
GATA-3 (C-18) goat polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz
GATA-3 (HG3-31) bzw. X mouse monoclonal IgG (0,2 bzw. 2 µg/µl)	Santa Cruz
GATA-4 (C-20) bzw. X goat polyclonal IgG (0,2 bzw. 2 µg/µl)	Santa Cruz
Goat anti-mouse IgG HRP (0,4 µg/µl)	Santa Cruz
Goat anti-rabbit IgG HRP (0,4 µg/µl)	Santa Cruz
HNF-3α (H-120) X rabbit polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz
Monoclonal anti-β-actin clone AC-15	Sigma-Aldrich Chemie
Pol II (N-20) rabbit polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz
Rabbit anti-goat IgG HRP (0,4 µg/µl)	Santa Cruz
Smad3 (FL-425) rabbit polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz
Stat5 (H-134) X rabbit polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz
Stat6 (C-20) X rabbit polyclonal IgG (2 µg/µl)	Santa Cruz
TFIID (TBP) (SI-1) rabbit polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz
YY1 (C-20) rabbit polyclonal IgG (0,2 µg/µl)	Santa Cruz

2.6 Computerprogramme

Tabelle 20. Computerprogramme.

Programm	Version	Hersteller
AxioVision	4.2	Carl Zeiss
Chromas	2.3	Technelysium
Gene Runner	3.05	Hastings Software Inc.
iCycler IQ	3.1.7050	Bio-Rad Laboratories
Quantity One	4.5.2	Bio-Rad Laboratories
TRANSFAC Professional	6.1 acad.	Biobase

Der Zugang zum TRANSFAC Professional wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Ralf Mrowka (Institut für Vegetative Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.7 Geräte

Tabelle 21. Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
AxioCAM MRc	-	Carl Zeiss
AxioPlan 2 Imaging System	-	Carl Zeiss
Brutschrank	B6	Heraeus
CO ₂ -Inkubator mit N ₂ /O ₂ -Regulierung	CB210	Binder

Electrophoretic Gel Systems	Midicell® Primo™	Thermo EC
GelCam	-	Polaroid
Gel Casting System	20 x 20 cm	Fisher Scientific
Gyro-Rocker®	-	Stuart Scientific
Hoefer™ Stab Gel Dryer	GD2000	Amersham Biosciences
Kaltlichtquelle	2500LCD	Leica
Kryostat	CM1900-1-VDE	Leica
Lumat	LB 9501	Berthold
Magnetrührer	TMC 2072	Schott
Mastercycler	gradient	Eppendorf
PowerPac	200 und 3000	Bio-Rad Laboratories
Rotoren	SLA-1500 und SS-34	Sorvall
Schüttelinkubator	3033	GFL
SmartSpec™	3000	Bio-Rad Laboratories
Sonifier	150	Branson Ultrasonics
Stereomikroskop	MZSL3	Leica
Test-Tube-Rotator	LD-79	MBT-Brand
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
UV-Transilluminator	FT-28/254 312	Fisher Scientific
Vertical Electrophoresis System	20 x 20 cm	Fisher Scientific
XCell II™ Blot Module	-	Invitrogen
Xcell <i>SureLock</i> ™ Mini-Cell	-	Invitrogen
Zentrifugen	5415D, 5417R und 5810R	Eppendorf
Zentrifuge	RC 5C Plus	Sorvall

2.8 Sonstige Materialien

Tabelle 22. Sonstige Materialien.

Produkt	Hersteller
Autoradiography Cassette	Fisher Scientific
Blotting Paper, 46 x 57 cm, 237 Grade	BioWORLD
Cell Scraper, 25 cm handle, 1,8 cm blade	Corning
Chromatography Paper, 20 x 20 cm, 3MM Chr	Whatman International
Falcon® konische Röhrchen 50 ml PP	Becton Dickinson
High-speed, Schwarzweiß-Film, Typ 667	Polaroid
Intensifying Screen	Fisher Scientific
Kodak BioMax MS Film	Kodak
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Biosciences
Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich (0,45 µm)	Invitrogen
Novex® 4-20% Tris-Glycin-Gele	Invitrogen
Pap Pen Mini	MBT-Brand
Peel-A-Way Embedding Mold	Ted Pella
Saran Verpackungsfolie	Dow Chemical Company
Spectra/Por® Membran (MWCO: 6-8.000)	Spectrum Laboratories
Superfrost Objektträger	Langenbrinck
Zentrifugenröhrchen 50 und 250 ml PP	Sorvall

3 METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der Zellen

Die humanen Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y, SK-N-AS und Kelly sowie die humane Zervix-Karzinom-Zelllinie HeLa wurden in RPMI-1640 + L-Glutamin sowie 10% v/v FKS und Penicillin/Streptomycin bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Die humane Teratokarzinom-Zelllinie NT2 wurde in DMEM/HAM's F-12 Medium + L-Glutamin sowie 10% v/v FKS und Penicillin/Streptomycin und zusätzlich 2 mM L-Glutamin bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Die humane Glioblastom-Zelllinie U-87 MG wurde in MEM + Earle + L-Glutamin sowie 10% v/v FKS und Penicillin/Streptomycin bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Die humanen Zelllinien HEK293 (Niere), HepG2 (Hepatoblastom) und U-2 OS (Osteosarkom) wurden in D-MEM + 4500 mg/l Glukose + L-Glutamin - Pyruvat sowie 10% v/v FKS und Penicillin/Streptomycin bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert.

Hypoxie wurde in einem luftdichten Binder-Inkubator (CB210 mit N₂/O₂-Regulierung), eingestellt auf 1% für 16 h oder 2% O₂ für 72 h, erreicht. Wenn angegeben, wurden die Zellen mit 5 U/ml rekombinantem humanem Epo (Epoetin beta, NeoRecormon) inkubiert.

3.1.2 Transfektion von Zellkulturen

3.1.2.1 Transiente Transfektion mit Vektoren

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von < 50% mit dem jeweiligen Vektor mittels FuGENE 6 Transfection Reagent in einem 3:1 FuGENE:DNA-Verhältnis transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

3.1.2.2 Transiente Transfektion mit *small interfering* RNA (siRNA)

SH-SY5Y Zellen wurden in 6-Well-Platten in Medium ohne Antibiotika ausgesät ($0,5 \times 10^6$ Zellen/Well). Nach 24 h wurden die Zellen mit 100 pmol siRNA (Tabelle 17) mittels Lipofectamine™ 2000 nach dem Protokoll des Herstellers zur siRNA-Transfektion transfiziert. 4-6 h sowie 48 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit vollständig supplementiertem Medium. 96 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1 ml Trizol® Reagent geerntet.

3.1.2.3 Stabile Transfektion mit Vektoren

SH-SY5Y Zellen wurden bei einer Konfluenz von $< 80\%$ mit dem entsprechenden Expressionsvektor (alle hervorgegangen aus pcDNA3.1(+)) mittels FuGENE 6 Transfection Reagent in einem 3:1 FuGENE:DNA-Verhältnis transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in ein frisches Medium mit 800 µg/ml Geneticin® (Neomycin) so aufgeteilt, dass sie weniger als 25% konfluent waren. Die Zellen wurden mit dem Selektionsmedium alle drei bis vier Tage gefüttert, bis Geneticin®-resistente Foci identifiziert wurden.

3.2 Reportergen-Assays

Für die Untersuchung der basalen Aktivitäten der Reportergen-Konstrukte wurden SH-SY5Y Zellen in 6-Well-Platten ausgesät ($0,4 \times 10^6$ Zellen/Well). Nach 24 h wurden die Zellen mit 1 µg des Reportergen-Konstruktes und 15 ng phRL-TK mittels FuGENE 6 Transfection Reagent in einem 3:1 FuGENE:DNA-Verhältnis co-transfiziert. Die Transfektion mit phRL-TK diente der Normalisierung der Transfektionseffizienz. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen nach dem Protokoll des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega) geerntet und die Luziferase-Aktivität in einem Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold) analysiert. Fünf unabhängige Wiederholungen für jede Bedingung wurden durchgeführt.

In einem zweiten Satz von Experimenten wurden die Zellen mit 1 µg des Reportergen-Konstruktes und 1 µg eines Expressionsplasmids für GATA-2, -3, -4, Sp1 oder des Leervektors pcDNA3.1(+) bzw. pN3 co-transfiziert. In diesem Fall war die Normalisierung der Transfektionseffizienz nicht möglich, da alle getesteten Kontrollvektoren (phRL-TK, CMV/β-Gal und pSV-β-Galactosidase Control Vector) unabhängig von ihren unterschiedlichen Promotoren durch die überexprimierten Transkriptionsfaktoren aktiviert wurden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen nach dem Protokoll des Luciferase Assay Systems (Promega) geerntet und die Luziferase-Aktivität analysiert. Für jede Bedingung wurden sechs unabhängige Wiederholungen durchgeführt.

3.3 RNA- und DNA-Techniken

3.3.1 RNA-Isolierung und -Quantifizierung

Die RNA wurde aus bis zu 5×10^6 Zellen einer < 80% konfluenten T75 Zellkulturflasche mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die RNA-Isolierung aus in 6-Well-Platten kultivierten Zellen wurde mittels Trizol® Reagent-Extraktion nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm, wobei $OD_{260} = 1,0$ einer Konzentration von 40 µg/ml entsprach. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.3.2 Reverse Transkription (RT)

2 µg RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)₁₅ Primer und 1 µl 10 mM dNTPs für 5 min bei 65°C in einem Thermomixer denaturiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Hinzugabe eines Mixes aus 4 µl 5x First-Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 40 U/µl RNasin sowie 0,5 µl 200 U/µl MMLV-Reverse Transkriptase wurde die Probe für 50 min bei 37°C und für 15 min bei 70°C im Mastercycler (Eppendorf) inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.3.3.1 Genexpressionsanalysen

Zur Analyse der Expression von unterschiedlichen Genen in Zelllinien bzw. Geweben wurde eine PCR mit spezifischen Primern (Tabelle 12) und der cDNA aus der jeweiligen Zelllinie bzw. dem Gewebe durchgeführt. Die cDNA aus humanen fetalen Geweben stammte aus einer kooperativen Studie mit dem Institut für Pathologie der Universität Bonn [114]. Das Studienprotokoll für die Untersuchung der Gewebeproben ist durch die dortige Ethikkommission genehmigt worden. Die PCR-Reaktion wurde im 25 µl Gesamtvolumen mit 1x Green GoTaq™ Buffer, 5 nmol dNTPs, je 5 pmol der beiden Primer und 1 U GoTaq™ DNA Polymerase durchgeführt.

Die Proben wurden im Mastercycler (Eppendorf) mit dem folgenden Programm amplifiziert: 2 min Denaturierung bei 95°C, 17-35x (45 sec Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei T_A wie in Tabelle 12 angegeben, 30 sec Elongation bei 72°C), 10 min Elongation bei 72°C, Kühlen auf 4°C. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf die korrekte Produktgröße überprüft.

3.3.3.2 Fragmentamplifizierung zur Klonierung

Zur Klonierung der Expressionsvektoren (Tabelle 23) sowie der Reporter-gen-Konstrukte (Tabelle 24) wurden Fragmente aus Plasmid-, genomischer oder cDNA zunächst mittels PCR amplifiziert, wobei spezifische Primer mit den entsprechenden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme am 5'-Ende verwendet wurden (Tabellen 14 und 15). Die PCR-Reaktion wurde in einem 50 µl Gesamtvolumen mit 1x Green GoTaq™ Buffer, 10 nmol dNTPs, je 24 pmol der beiden Primer, 4% DMSO und 2 U GoTaq™ DNA Polymerase durchgeführt.

Die Proben wurden im Mastercycler (Eppendorf) mit dem folgenden Programm amplifiziert: 2 min Denaturierung bei 95°C, 33x (45 sec Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei 55°C, 1 min/1000 bp Elongation bei 72°C), 10 min Elongation bei 72°C, Kühlen auf 4°C. Die

PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend aus dem Gel extrahiert und gereinigt.

Tabelle 23. Klonierung der Expressionsvektoren für hGATA-2, hGATA-3 und hGATA-4. Die Größe des Inserts gibt die Länge des Fragments nach dem Restriktionsverdau wieder.

Vektor	Primerpaar	Restriktionsenzyme	Größe des Inserts
pcDNA3.1/hGATA-2	IP15+/IP16-	<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I	1463 bp
pcDNA3.1/hGATA-3	IP17+neu2/IP18-neu	<i>Xho</i> I/ <i>Xba</i> I	1351 bp
pcDNA3.1/hGATA-4	IP19+/IP20-	<i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I	1348 bp

Tabelle 24. Klonierung der Reportergen-Konstrukte für die 5'-flankierende Region des *EpoR*-Gens. Die Bezeichnung bezieht sich auf die Lage der Oligonukleotide relativ zur Transkriptionsstartstelle. Die Fragmente wurden in die *Xho* I/*Hind* III-Schnittstellen des pGL2-Basic Vektors (Promega) kloniert. Die Größe des Inserts gibt die Länge des Fragments nach dem Restriktionsverdau wieder.

Konstrukt	Primerpaar	Größe des Inserts
-449/+33	IP1+/IP4-	492 bp
-449/-316	GLprimer1/IP37-	148 bp
-449/-301	IP1+/IP38-	163 bp
-449/-249	IP1+/IP2-	211 bp
-75/+33	IP3+/IP4-	118 bp
+202/+441	IP13+/IP14-	250 bp

Die humanen Expressionsvektoren pRSV/neo+GATA-2 und RSV/hGATA3 erhielten wir von Prof. Dr. Constance T. Noguchi (Molecular Medicine Branch, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [100] bzw. Prof. Dr. James D. Engel (Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, USA) [101]. Der Expressionsvektor für hGATA-4 wurde selbständig in pcDNA3.1(+) (Invitrogen) mittels PCR-Amplifikation der *full-length* cDNA generiert und publiziert (GenBank Accession No. AY740706) [115]. Damit für alle zu untersuchenden GATA-Transkriptionsfaktoren das gleiche Expressionsplasmid als Leervektor bei den Reporterergen-Assays verwendet werden konnte, wurden die Sequenzen für hGATA-2 und -3 aus den uns zur Verfügung gestellten Vektoren in pcDNA3.1(+) umklontiert.

3.3.3.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Mutagenese von Reporterergen-Konstrukten mittels Overlap-Extension-PCR

Tabelle 25. Mutagenese der Reporterergen-Konstrukte mittels OE-PCR. Die Größe des Inserts gibt die Länge des Fragments nach dem Restriktionsverdau wieder.

Konstrukt	Primerpaare		Größe des Inserts
	Vorläufige Fragmente	End-fragment	
Ets-2 mut +19	IP3+/IP34-mut, IP35+mut/IP31-	IP3+/IP4-mut	118 bp
GATA mut -44	Glprimer1/GATA-54mR2, GATA-54mF2/IP31-	IP3+/IP4-	118 bp
GATA mut -271	IP1+/GATA-286mR, GATA-286mF/IP31-	IP1+/IP2-	211 bp
Sp1 mut -17	IP3+/IP41-mut, IP42+mut/IP31-	IP3+/IP4-	118 bp
Sp1 mut -300	IP1+/IP39-mut, IP40+mut/IP33-	IP1+/IP2-	211 bp

Die Mutagenese der Reportergen-Konstrukte (Tabelle 25) wurde mittels Overlap-Extension-PCR (OE-PCR) durchgeführt [116]. Die PCR-Reaktion wurde wie unter 3.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach Aufreinigung aus dem Agarosegel wurde jeweils 1 µl der beiden PCR-Produkte für eine weitere PCR eingesetzt, um das vollständige mutierte Fragment zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend aus dem Gel extrahiert und gereinigt.

3.3.3.4 Amplifizierung von genregulierenden Sequenzen

Bei dem ChIP-Assay wurden genregulierende Sequenzen aus genomischer DNA mit spezifischen Primern (Tabelle 18) amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde in einem 25 µl Gesamtvolumen mit 1x Green GoTaq™ Buffer, 5 nmol dNTPs, je 5 pmol der beiden Primer und 1 U GoTaq™ DNA Polymerase durchgeführt.

Die Proben wurden im Mastercycler (Eppendorf) mit dem folgenden Programm amplifiziert: 2 min Denaturierung bei 95°C, 34x (45 sec Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei 60°C, 30 sec Elongation bei 72°C), 10 min Elongation bei 72°C, Kühlen auf 4°C. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf die korrekte Produktgröße überprüft.

3.3.4 Real-time PCR

Für die Quantifizierung der RNA wurde eine TaqMan Real-time PCR mit kommerziell erhältlichen Primern (TaqMan® Gene Expression Assays, Tabelle 16) und dem TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (20 µl-Ansatz, Denaturierung auf 20 s erhöht). Die RNA-Menge wurde anhand von Standardreihen mit dem Programm iCycler IQ 3.1.7050 (Bio-Rad Laboratories) errechnet und im Verhältnis zur Menge der *β-Aktin* mRNA angegeben.

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele wurden durch Auflösen von 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer für ein 1%-iges Gel (w/v) hergestellt. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 50°C wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Die PCR-Produkte enthielten durch den 5x Green GoTaq™ Buffer bereits einen Ladepuffer, während andere DNA-Proben mit 1x Ladepuffer versetzt werden mussten, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. 0,7 µg des 1 Kb Plus DNA Ladders wurde als Größenmarker verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm für 0,5-1 h durchgeführt. Die getrennte DNA wurde unter UV-Licht durch die mit der DNA interkalierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids sichtbar.

3.3.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und gereinigt.

3.3.7 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

3.3.7.1 DNA-Verdau für die Ligation

DNA-Fragmente nach Agarosegel-Extraktion sowie 3 µg Plasmid-DNA wurden jeweils mit zwei Restriktionsendonukleasen (jeweils 2 µl) in einem 60 µl-Ansatz verdaut. Die Restriktionsenzyme entsprachen den Erkennungssequenzen, die in den Primern für die Klonierung der Konstrukte verwendet wurden (Tabellen 14 und 15). Der Ansatz für den Verdau enthielt ebenfalls einen für beide Enzyme geeigneten 10x Puffer sowie 1 µl BSA (10 mg/ml) und wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.7.2 Kontrolle von DNA-Präparationen

Nach einer Plasmid-DNA-Präparation wurden ca. 500 ng DNA in einem 20 µl-Ansatz verdaut. Jeweils 0,5 µl von beiden Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen das Insert flankierten, sowie 2 µl eines geeigneten 10x Puffers wurden eingesetzt. Der Verdau wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Vorhandensein des Inserts wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

3.3.8 Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden

Nach dem Verdau wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 70°C deaktiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 µl CIAP (1 U/µl) für 5 min bei 37°C dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl EDTA (250 mM) und Erhitzen auf 65°C für 15 min abgestoppt.

3.3.9 DNA-Aufreinigung

3.3.9.1 Phenol-Chloroform-DNA-Extraktion

Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16.000 x g wurde die DNA-enhaltende obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Bedarf wurde die Extraktion mit einem Volumen Chloroform wiederholt.

3.3.9.2 DNA-Fällung

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, 2,5 Volumen 100% v/v Ethanol und bei Bedarf mit 1 µl Glycogen für 20 min bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (20.000 x g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet mit 70% v/v Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem angemessenen Volumen dH₂O aufgelöst.

3.3.10 Ligation

100 ng Plasmid-DNA und 100-300 ng DNA-Fragmente (abhängig von der Größe) wurden mit 1/5 Volumen des 5x DNA Ligase Buffers sowie 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl für 8 h bei 16°C ligiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend bis zur Transformation bei 4°C gekühlt.

3.3.11 Transformation von Bakterien

SoloPack® Gold Supercompetent Cells (Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut und anschließend leicht gemischt. Nach Zugabe von 1 µl XL10-Gold β-Mercaptoethanol (β-ME) Mix wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, wobei sie alle 2 min leicht gemischt wurden. 0,01-100 ng DNA wurden hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock von 42°C wurde für 1 min durchgeführt. Nach einer Inkubation für 2 min auf Eis wurden 150 µl vorgewärmtes S.O.C. Medium hinzugegeben. Der Transformationsmix wurde für 1 h bei 37°C und 300 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. 10-100 µl des Mixes wurden auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.12 Plasmid-Präparation

3.3.12.1 Minipräparation

Für eine Minipräparation der Plasmid-DNA wurden 4 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin) mit einer einzelnen Kolonie der SoloPack® Gold Supercompetent Cells, die das geeignete Plasmid enthielt, angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C für 12-16 h inkubiert. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

3.3.12.2 Maxipräparation

Für eine Maxipräparation der Plasmid-DNA wurden 150-250 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin) mit einer einzelnen Kolonie der SoloPack® Gold Supercompetent Cells, die das geeignete Plasmid enthielt, angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C für 12-16 h inkubiert. Die Bakterien wurden für 10 min bei 6.500 x g und 4°C in 250 ml-Zentrifugenröhrchen (Sorvall) pelletiert. Das Pellet wurde in 7,5 ml GTE-Puffer resuspendiert und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Sorvall) überführt. Zur Zelllyse wurden der Probe 25 mg Lysozym hinzugefügt. Die Probe wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von frisch hergestellten alkalischen SDS Puffer folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Anschließend wurden 11,25 ml 3 M Kaliumacetat (pH 4,8-5,2) hinzugefügt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 9.000 x g und 4°C wurde der Überstand in 50 ml Falcon®-Röhrchen überführt, wobei die Probe auf zwei Röhrchen verteilt wurde. Zu jedem Röhrchen wurden 10 ml Isoopropanol hinzugegeben, und die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 3.200 x g und 4°C wurde der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde umgehend in 2 ml TE-Puffer (pH 7,4) resuspendiert, wobei die Proben wieder in einem Röhrchen vereinigt wurden. 2,3 ml 8 M Ammoniumacetat wurden zugegeben und mindestens für 1 h auf Eis im Kühlschrank inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 25 min bei 3.200 x g und 4°C wurde der Überstand in ein neues Falcon®-Röhrchen überführt. Die

Plasmid-DNA wurde mit 15 ml 100% v/v Ethanol für 15 min auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation für 25 min bei 3.200 x g und 4°C wurde der Überstand abgegossen und das Röhrchen kopfüber ausgetrocknet. Das Pellet wurde in 800 µl TE-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Vorhandene RNA wurde durch eine Inkubation für 20 min mit 1 µl RNase A (100 mg/ml) bei 37°C abgebaut. Anschließend wurden 350 µl 5 M NaCl sowie 300 µl 30% w/v PEG hinzugeben und die Probe mindestens für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 25 min bei 20.800 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für 1-2 min getrocknet. Das Pellet wurde in 450 µl TE-Puffer (pH 7,4) für 1 h bei 37°C ohne Mischen aufgelöst und danach durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 5 M NaCl wurde die DNA mit 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Das Gemisch wurde für 15 min bei 16.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die DNA-enthaltende obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 500 µl Phenol:Chloroform (5:1) extrahiert. Anschließend wurde eine Fällung der DNA mit 1 ml 100% v/v Ethanol durchgeführt. Das Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation für 30 min bei 20.800 x g und 4°C pelletiert und anschließend mit 1 ml 70% v/v Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und je nach Größe in 500-1000 µl TE-Puffer (pH 7,4) resuspendiert.

3.3.13 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der DNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm, wobei $OD_{260} = 1,0$ einer Konzentration von 50 µg/ml entsprach.

3.4 Protein-Techniken

3.4.1 Ganzzellprotein-Extrakte

3.4.1.1 Extraktion mit 1x Probenpuffer

Zellen wurden bei einer Konfluenz < 80% mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend in 1x Probenpuffer lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Scherung der DNA sonifiziert. Die Ganzzellprotein-Extrakte wurden bei -20°C gelagert.

3.4.1.2 Extraktion mit RIPA-Puffer

Zellen wurden bei einer Konfluenz < 80% trypsinisiert und in 50 ml-Falcon®-Röhrchen pelletiert. Das Pellet wurde mit kaltem 1x PBS gewaschen, in 5 Volumen RIPA-Puffer aufgelöst und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 20.800 x g und 4°C wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Ganzzellprotein-Extrakte wurden bei -20°C gelagert.

3.4.2 Kernprotein-Extrakte

Zellen in 40 100x20 mm-Zellkulturschalen bei einer Konfluenz < 80% wurden mit kaltem 1x PBS gewaschen, in 1-2 ml kaltem 1x PBS abgeschabt und in Falcon®-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für 3 min bei 290 x g und 4°C pelletiert und anschließend mit kaltem 1x PBS gewaschen. Das Pellet wurde im gleichen Volumen Lysepuffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für 3 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 500 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde ohne Mischen in 0,75-1 Volumen NE-Puffer aufgenommen und für 1 h bei 4°C langsam auf einem Rotator resuspendiert. Die Proteine wurden für 10 min bei 12.850 x g und 4°C

pelletiert und anschließend über Nacht im Dialysepuffer unter langsamem Rühren bei 4°C dialysiert (Spectra/Por® Membran, MWCO: 6-8.000). Nach einem Wechsel des Dialysepuffers am nächsten Morgen wurde die Dialyse für 2 h fortgesetzt. Anschließend wurde die Proteinlösung in Portionen à 30-100 µl aliquotiert und in einem Trockeneis/Ethanol-Bad schockgefroren. Die Kernprotein-Extrakte wurden bei -80°C gelagert.

3.4.3 Proteinquantifizierung

Die Konzentration der Ganzzellprotein-Extrakte, die mit RIPA-Puffer hergestellt wurden, sowie die Kernprotein-Extrakte wurden mit dem Protein Assay Reagent von Bio-Rad Laboratories nach der Bradford-Methode anhand des Protokolls des Herstellers ermittelt. Bei Ganzzellprotein-Extrakten, die mit 1x Probenpuffer hergestellt wurden, konnte die Konzentration wegen des Farbstoffes im Puffer nicht ermittelt werden.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinextrakte wurden auf Novex® 4-20% Tris-Glycin-Gelen (Invitrogen) unter denaturierenden Bedingungen (1x Laufpuffer) aufgetrennt. Die Elektrophorese der zuvor für 5 min bei 95°C denaturierten Proben wurde in einem Tank (XCell *SureLock*™ Mini-Cell, Invitrogen) bei 20 mA für ca. 15 min und dann bei 30 mA für 1-2 h durchgeführt. Als Marker für das Molekulargewicht wurde Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad Laboratories) verwendet.

3.4.5 Western Blot

Die mit der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm) mittels Elektrotransfer im Tanksystem überführt. Das Gel wurde in einem fertigen

Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich (Invitrogen) auf die Kathodenseite des XCell II™ Blot Modules (Invitrogen) platziert. Der Transfer wurde im 1x Transferpuffer für 1,5 h bei 30 V/Gel auf Eis durchgeführt. Die Membran wurde anschließend in TBST mit 5% w/v Magermilch für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Nach Waschen in TBST (3x 5 min) wurde die Membran mit dem primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran in TBST gewaschen (2x abspülen, 1x 15 min, 2x 10 min) und mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (2x abspülen, 1x 15 min, 2x 10 min) wurden die Proteine mit ECL Detection Reagents (Amersham Biosciences) detektiert. Tabelle 26 zeigt die verwendeten Antikörperkombinationen und -verdünnungen.

Tabelle 26. Antikörperkombinationen und -verdünnungen für Western Blot-Analysen. Die Antikörper wurden in TBST mit 5% w/v Magermilch verdünnt.

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Epo (N-19) goat polyclonal IgG, 1:500	Rabbit anti-goat IgG HRP, 1:5.000
EpoR (C-20) rabbit polyclonal IgG, 1:1.000	Goat anti-rabbit IgG HRP, 1:10.000
EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG, 1:100	Goat anti-rabbit IgG HRP, 1:2.000
GATA-2 (CG2-96) mouse monoclonal IgG, 1:100	Goat anti-mouse IgG HRP, 1:2.000
GATA-3 (HG3-31) mouse monoclonal IgG, 1:100	Goat anti-mouse IgG HRP, 1:2.000
GATA-4 (C-20) goat polyclonal IgG, 1:500	Rabbit anti-goat IgG HRP, 1:10.000
Monoclonal anti-β-actin clone AC-15, 1:1.000	Goat anti-mouse IgG HRP, 1:10.000

3.5 DNA-Protein-Bindungsstudien

3.5.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

3.5.1.1 Herstellung der Sonden

Die chemisch synthetisierten Oligonukleotide (Tabelle 13) wurden in TE-Puffer (pH 7,4) aufgelöst (1 µg/µl) und mit dH₂O verdünnt (100 ng/µl). Zur radioaktiven Markierung der Oligonukleotide wurden 1 µl der Erststrang-Oligonukleotide (100 ng/µl), 4 µl dH₂O, 1 µl 10x T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer, 1 µl T4 Polynucleotide Kinase (10 U/µl) und 3 µl ATP gamma ³²P (30 µCi) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 90°C inaktiviert. Nach Zugabe von 4 µg Zweitstrang-Oligonukleotide (100 ng/µl) und 86 µl dH₂O wurde die Probe für 10 min bei 90°C denaturiert, 2-3 h bei Raumtemperatur hybridisiert und kurz anzentrifugiert. Die Sonde wurde über eine Sephadex™ G-25-Säule (MicroSpin™ G-25 Column, Amersham Biosciences) aufgereinigt und bei -20°C aufbewahrt.

3.5.1.2 Herstellung der Kompetitoren

Nicht markierte Wildtyp- bzw. mutierte Kompetitoren wurden folgendermaßen hergestellt: 10 µl Erststrang-Oligonukleotide (1 µg/µl) wurden mit 40 µl Zweitstrang-Oligonukleotide (1 µg/µl) vermischt, für 10 min bei 90°C denaturiert und anschließend für 2-3 h bei Raumtemperatur hybridisiert. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.5.1.3 Polyacrylamid-Gele

Für die EMSA-Experimente wurden senkrechte, nicht-denaturierende, 5%-ige Polyacrylamid-Gele (20 x 20 x 0,5 cm) in dem Gel Casting System (Fisher Scientific) gegossen. Dafür wurden 7,5 ml 40% Acrylamide/Bis Solution 19:1 und 12,5 ml 5x TBE mit dH₂O auf 60 ml aufgefüllt und mit 600 µl Ammoniumpersulfat sowie 60 µl Temed versetzt. Nach der

Polymerisation wurde das Gel in dem Vertical Electrophoresis System (Fisher Scientific) in 0,5x TBE platziert und ein ca. 20-minütiger Vorlauf bei 12 mA gestartet.

3.5.1.4 EMSA-Experiment

Die Proben bestehend aus 1 µl BSA (1 µg/µl), 3 µl Poly-[d(I-C)] (0,5 µg/µl), 1 µl Herring Sperm DNA (0,1 µg/µl), 8 µg Kernprotein-Extrakte, Bindungspuffer ([Gesamtvolumen-Proteinvolumen]/2), eventuell 2 µl Wildtyp- oder mutierten Kompetitor (400-facher Überschuss) und dH₂O wurden für 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde je 1 µl der Sonde hinzugegeben und für 45 min bei 30°C inkubiert. Wo angegeben, wurden 2 µl der entsprechenden Antikörper (2 µg/µl) hinzugefügt und für 20 min bei 30°C inkubiert. Die DNA-Protein-Komplexe wurden bei einer konstanten Stromstärke von 12 mA auf das Gel aufgetragen und nach einer Einlaufzeit von 20-30 min für 2 h bei 34 mA aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf einem Gelrockner (Hoefer™ Stab Gel Dryer GD2000, Amersham Biosciences) bei 80°C getrocknet. Die Komplexe wurden mittels Autoradiographie mit oder ohne Verstärkerfolie (Intensifying Screen, Fisher Scientific) visualisiert.

3.5.2 Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay)

Der ChIP-Assay wurde von der studentischen Hilfskraft Christiane Hussels mit dem Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay (Upstate) weitgehend nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden 1×10^6 SH-SY5Y-Zellen pro Ansatz nach dem Trypsinieren mit 2,7%-igem Formaldehyd behandelt, was zum Crosslinking der Proteine an die DNA führt. Die Zellen und die Kernmembranen wurden nacheinander lysiert. Die DNA wurde dann mittels Ultraschall geschert [98], die DNA-Proteinkomplexe über spezifische Antikörper (je 4 µg/Ansatz) und Protein A Agarose aufgereinigt. Die nach dem Auflösen des Crosslinks aufgereinigte DNA konnte für die Amplifizierung von regulierenden Sequenzen des Zielgens mittels PCR verwendet werden.

3.6 Immunhistochemie

Die Präparation der embryonalen und fetalen Mäuse, die nachfolgende Aufarbeitung der Gewebe und die immunhistologischen Untersuchungen wurden von der studentischen Hilfskraft Thomas Wallach durchgeführt.

3.6.1 Tierpräparationen und Gewebefixierung

Mäuseembryonen des Wildtypstammes CD1 wurden nach terminierter Verpaarung in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (E11,5-E18,5) entnommen. *Per definitionem* wurde der Morgen, an dem bei dem Weibchen ein vaginaler Schleimpfropf festgestellt wurde, als Tag E0,5 festgesetzt. Die Präparation der Embryonen erfolgte, nachdem der Tod der trächtigen Maus per Genickbruch herbeigeführt wurde. Die Bauchdecke wurde mit Ethanol benetzt und vorsichtig mit einer Schere eröffnet. Der Uterus wurde mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette freigelegt. Die Präparation der Embryonen erfolgte unter einem Stereomikroskop mit externer Kaltlichtquelle. Die Embryonen wurden mit zwei Pinzetten aus dem Uterus entnommen, wobei der Dottersack nicht beschädigt werden sollte. Erst kurz vor der eigentlichen Präparation der Embryonen bzw. Feten wurde der Dottersack geöffnet und das Amnion entfernt. Unter dem Stereomikroskop wurde das korrekte Gestationsalter anhand morphologischer Kriterien bestätigt [117].

Für die Präparation des Rückenmarks wurden die Extremitäten sowie der Kopf des Embryos mit einer gebogenen Kanüle abgetrennt. Die Bauchdecke wurde mit zwei Pinzetten eröffnet und die inneren Organe entfernt, bis die Rippen und das Rückenmark sichtbar wurden. Der Thorakalbereich wurde dann durch Nadeln in einer Sylgardschale fixiert. Nachfolgend konnte das Rückenmark mit einer Feinschere frei präpariert werden. Andere Gewebeanteile wurden von beiden Seiten des Rückenmarks entfernt. Bei der Präparation des Gehirns wurde das gesamte Organ mit Feinpinzetten isoliert. In einigen Fällen wurde der gesamte Embryo präpariert. Das präparierte Rückenmark wurde für 1 h, das Gehirn oder gesamte Embryonen für 2 h in 10 ml 4% w/v Paraformaldehyd bei 4° C unter leichtem Schütteln fixiert.

3.6.2 Kryokonservierung und Gewebeschnitte

Unmittelbar nach der Fixierung wurden die Gewebe 3x kurz in kaltem 1x PBS gewaschen. Dann folgte ein weiterer Waschschrift unter leichtem Schütteln in 1x PBS über 1 h. Anschließend wurden die Gewebe in einer 30% w/v Saccharoselösung (in 1x PBS) über Nacht gewaschen. Diese Arbeitsschritte wurden alle bei 4° C durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte mit einer Rasierklinge die Teilung des Rückenmarks in ein zervikales, thorakales bzw. lumbales Segment. Die einzelnen Segmente wurden in dem Einbettmedium Tissue-Tek O.T.C. kurz gewaschen und dann unter einem Stereomikroskop mit einer ausgewählten Position in Einbettformen (Peel-A-Way Embedding Mold) gebracht und schockgefroren. Das Gehirn bzw. die vollständigen Embryonen wurden die gleiche Weise eingefroren. Die Gewebeblöcke wurden bei -80° C gelagert.

Im Kryostat (Leica) wurden 5-10 µm dicke Kryoschnitte bei -20° C angefertigt. Die Ausrichtung des dorsalen Rückenmarks, Gehirns bzw. Embryos zur Klinge hin ermöglichte eine stabile Schnittführung. Die Schnitte wurden auf Superfrost Objektträger überführt und für 1 h bei 37° C getrocknet. Die Schnitte wurden bei -80° C gelagert.

3.6.3 Immunhistologische Färbungen

Die Schnitte wurden auf dem trockenen Objektträger mit einem Fettstift (Pap Pen Mini, MBT-Brand) umrandet und mit 1 ml Blockingpuffer für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden dann kurz in 1x PBS in einer Färbeküvette gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation bei 4° C über Nacht mit den jeweiligen primären Antikörpern (20 µl pro Gewebeschnitt). Für Doppelfärbungen wurden die beiden primären Antikörper gleichzeitig aufgetragen. Negativkontrollen wurden ohne die primären Antikörper inkubiert und durchliefen analog alle weiteren Färbeschritte. Nach einem kurzen Waschen in 1x PBS und 3 weiteren Waschschritten für 10 min mit Blockingpuffer erfolgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur mit den geeigneten sekundären Antikörpern. Wegen der Inkubation mit den fluoreszierenden sekundären Antikörpern

mussten die weiteren Arbeiten mit einem Lichtschutz unter einer Aluminiumfolie durchgeführt werden. Nach kurzem Waschen in 1x PBS und 3 weiteren Waschschritten für 10 min in Blockingpuffer, gefolgt von einem abschließenden Waschschriff in 1x PBS wurden die Objektträger kurz an der Luft getrocknet und mit Vectashield Mounting Medium H-1200 mit DAPI, das die Visualisierung der Zellkerne ermöglicht, eingedeckelt. Eine Versiegelung der Schnitte erfolgte durch eine Umrandung des Deckgläschens mit klarem Nagellack. Tabelle 27 fasst die verwendeten Antikörperkombinationen unter Angabe der Verdünnungen zusammen.

Tabelle 27. Antikörperkombinationen und -verdünnungen für immunhistochemische Färbungen. Die Antikörper wurden in Blockingpuffer verdünnt.

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Anti-mouse Epo R, 1:100	Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L), 1:500
EpoR (C-20) rabbit polyclonal IgG, 1:100	Cy TM 3-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ fragment donkey anti-rabbit IgG (H+L), 1:10.000
EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG, 1:100	Cy TM 3-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ fragment donkey anti-rabbit IgG (H+L), 1:10.000
GATA-2 (C-20) goat polyclonal IgG, 1:100	Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L), 1:500
GATA-3 (C-18) goat polyclonal IgG, 1:100	Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L), 1:500
GATA-4 (C-20) goat polyclonal IgG, 1:100	Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (H+L), 1:500
Sp1 (PEP 2) rabbit polyclonal IgG, 1:100	Cy TM 3-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ fragment donkey anti-rabbit IgG (H+L), 1:10.000

3.6.4 Bildaufnahme und digitale Bildbearbeitung

Die Mikroskopie erfolgte mit einem hochauflösenden Mehrkanal-Fluoreszenzmikroskop (AxioPlan 2 Imaging System, Carl Zeiss), an welches eine Digitalkamera (AxioCAM MRc, Carl Zeiss) angeschlossen war. Die Bilder wurden mit dem Programm AxioVision 4.2 (Carl Zeiss) aufgenommen und digital bearbeitet. Bilder der Negativkontrollen wurden mit den gleichen Belichtungszeiten wie die positiv gefärbten Präparate aufgenommen. Für die Abbildungen mit den immunhistologischen Färbungen wurden Übersichtsschemata anhand der DAPI-Übersichtsbilder, wie in Abbildung 5 dargestellt, generiert.

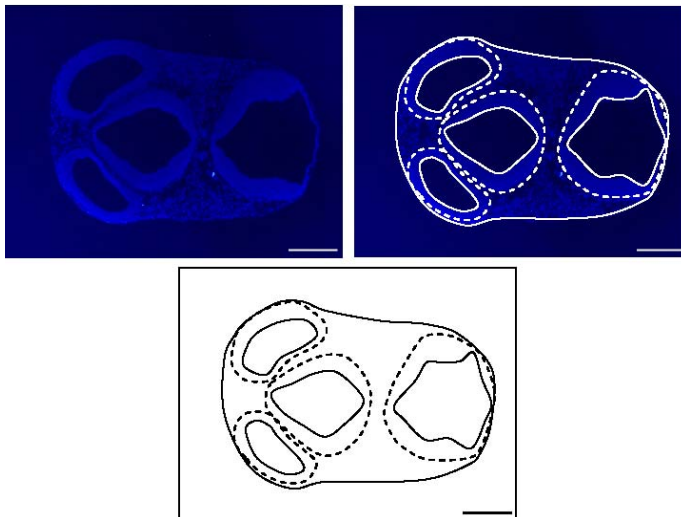


Abbildung 5. Generierung eines Übersichtsschemas anhand des DAPI-Übersichtsbildes von einem Gehirnschnitt der embryonalen Maus (E11,5). Maßstabsbalken 500 μm .

3.7 Statistische Analysen

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurde mittels Student's *t*-Test mit Microsoft Office Excel 2003 untersucht. Ein *p*-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

4 ERGEBNISSE

Die Untersuchung der transkriptionellen Regulation des *EpoR*-Gens im ZNS umfasste neben einer Analyse der Regulationsmechanismen mit molekularbiologischen Methoden in einem zellulären System auch die Klärung der Expression des Zielgens und der potentiellen Regulatoren *in vivo*.

4.1 Immunhistochemie im zentralen Nervensystem (ZNS) der embryonalen und fetalen Maus

Zunächst wurden die Expressionsmuster von EpoR sowie GATA-2, -3 und -4 im Rückenmark und Gehirn der embryonalen bzw. fetalen Maus im Verlauf der intrauterinen Entwicklung (E11,5, E14,5 und E18,5) mittels Immunhistochemie analysiert. Außerdem wurden Doppelfärbungen durchgeführt, die Aufschluss über eine Co-Expression von EpoR und den GATA-Transkriptionsfaktoren im ZNS geben sollten.

Da in hämatopoietischen Zellen eine Kooperation von GATA-1 und Sp1 bei der *EpoR*-Regulation beschrieben wurde [62], wurden die Sp1-Expression sowie die Co-Lokalisation von Sp1 und den GATA-Faktoren ebenfalls analysiert.

4.1.1 EpoR

Die Expression des EpoR wurde mit dem EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG der Firma Santa Cruz untersucht.

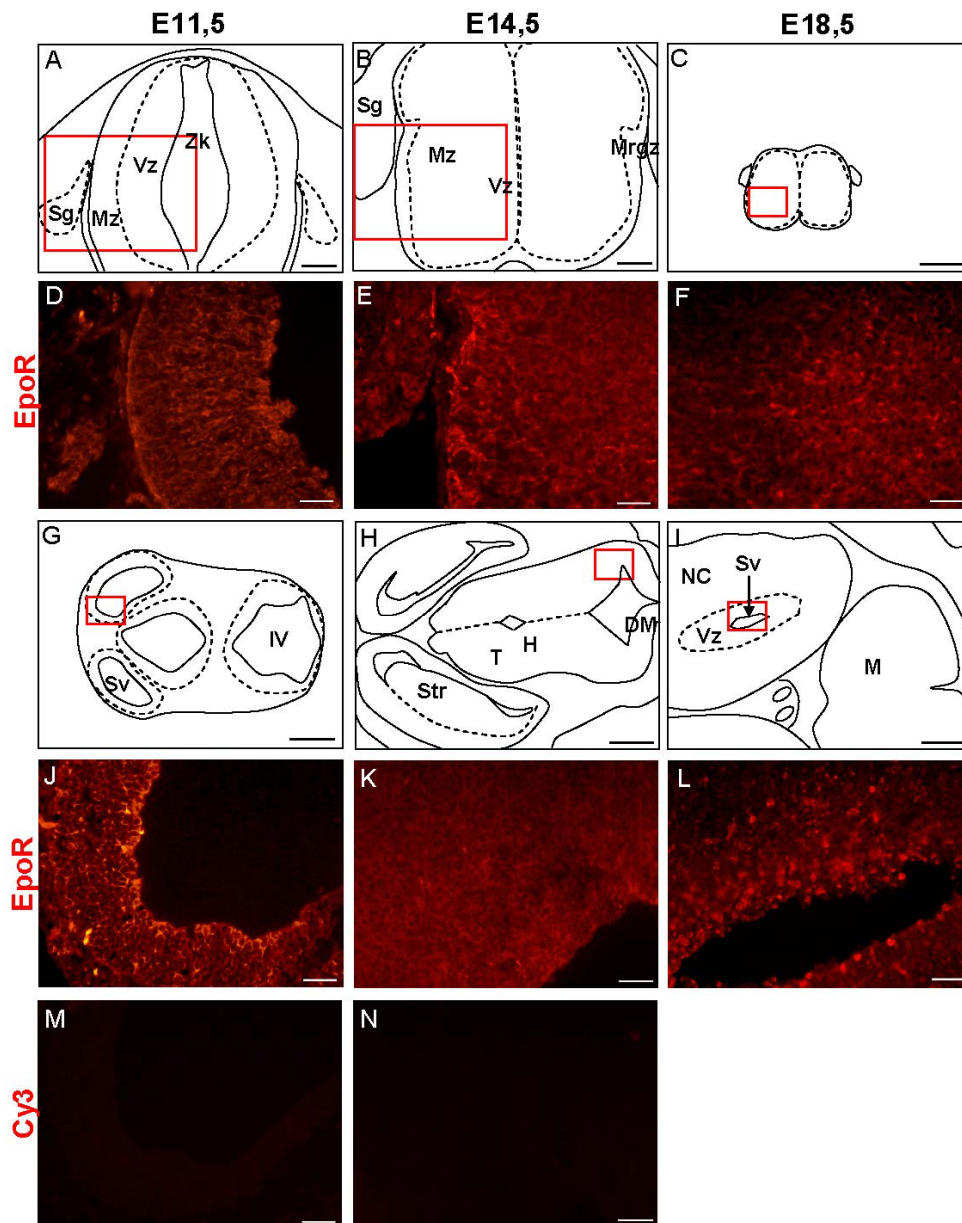


Abbildung 6. EpoR Expression (rot) im Rückenmark und Gehirn der sich entwickelnden Maus (E11,5-E18,5). Antikörper: EpoR rabbit polyclonal antibody (M-20, Santa Cruz) + CyTM 3-conjugated donkey anti-rabbit IgG. Die roten Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. (A-F) Rückenmark; Schnittorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral. (G-N) Gehirn; Schnittorientierung: rechter Bildabschnitt = dorsal, linker Bildabschnitt = ventral. In (M) und (N) werden beispielhaft zwei Negativkontrollen gezeigt, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden und die gleichen Bereiche wie (J) und (K) zeigen. DM = Deckplatte des Mittelhirns, H = Hypothalamus, M = Mittelhirn, Mrgz = Marginalzone, Mz = Mantelzone, NC = *neopallial cortex* (späterer Cortex), Sg = Spinalganglion, Str = Striatum, Sv = Seitenventrikel, T = Thalamus, Vz = Ventrikularzone, IV = Vierter Ventrikel, Zk = Zentralkanal. Maßstabsbalken: (A, B) 100 μ m, (C, G-I) 500 μ m, (D-F, J-N) 50 μ m.

In den Entwicklungsstadien E11,5-E18,5 fand sich im gesamten Rückenmark sowie im Spinalganglion eine Färbung mit leicht abnehmender Intensität im Laufe der Entwicklung (Abbildung 6, A-F). Die Färbung im Gehirn nahm während der Entwicklung deutlicher ab. Am Entwicklungstag E11,5 war das gesamte Neuroepithel stark angefärbt (Abbildung 6, G, J), während die Färbung im Mittel- und Vorderhirn am Tag E14,5 eine schwächere Intensität aufwies (Abbildung 6, H, K). Später in der Entwicklung (E18,5) fand sich nur noch in der Ventrikularzone der Seitenventrikel eine intensive Färbung (Abbildung 6, I, L), während der Rest des Gehirns keine Färbung aufwies.

4.1.2 GATA-Transkriptionsfaktoren

Die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3 und -4 unterlag entwicklungs- und zelltypspezifischen Veränderungen. In den Tabellen 28 und 29 sind die Expressionsmuster der Faktoren im embryonalen Rückenmark und Gehirn am Tag E11,5-E18,5 zusammengefasst.

Im Entwicklungsstadium E11,5 fand sich eine starke GATA-2 Färbung in den Zellkernen von Zellen der Spinalganglien und der Mantelzone des Rückenmarks. In der Ventrikularzone konnte nur eine schwache GATA-2 Expression nachgewiesen werden. Die GATA-2 Expression nahm im Verlauf der Entwicklung ab und konnte an den Tagen E14,5 und E18,5 nur noch in einzelnen Kernen in Zellen des Rückenmarks gefunden werden (Abbildung 7, A-F). Im embryonalen Gehirn war GATA-2 zunächst in beinahe allen Zellen der Ventrikular- und Mantelzone nachweisbar (E11,5). Die Expression nahm im Verlauf ab und fand sich im Entwicklungsstadium E14,5 lediglich in einzelnen Zellen der Mantelzone des Mittel- und Vorderhirns (Abbildung 7, G-J) und später (E18,5) nur in Zellen des Mittelhirns.

Die GATA-2 exprimierenden Zellen zeigten – abgesehen von Gehirn im Entwicklungsstadium E18,5 – in allen Bereichen eine Doppelfärbung mit dem EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG (Abbildung 8).

Tabelle 28. Expressionsmuster von GATA-2, -3 und -4 im Rückenmark von Mausembryonen in den Entwicklungsstadien E11,5, E14,5 und E18,5.

	GATA-2	GATA-3	GATA-4
E11,5	<ul style="list-style-type: none"> • Schwache Kernfärbung in der Ventrikularzone • Starke Kernfärbung in der Mantelzone, im Spinalganglion und Notochord 	<ul style="list-style-type: none"> • Kernfärbung in zwei kleinen Inseln des ventralen Teils der Mantelzone 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytoplasmatische Färbung in Zellen der Bodenplatte und im Notochord • Schwache cytoplasmatische Färbung in der ventralen Mantelzone
E14,5	<ul style="list-style-type: none"> • Einzelne Kernfärbungen im Rückenmark und im Spinalganglion 	<ul style="list-style-type: none"> • Einzelne Kernfärbungen im mittleren und ventralen Teil der Mantelzone 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytoplasmatische Färbung in Zellen der Bodenplatte, Ependymalzone, Marginalzone und im Spinalganglion
E18,5	<ul style="list-style-type: none"> • Einzelne Kernfärbungen im Rückenmark und im Spinalganglion 	<ul style="list-style-type: none"> • Nur einzelne Kernfärbungen im mittleren und ventralen Teil der Mantelzone 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytoplasmatische Färbung in der Ependymalzone, Marginalzone und im Spinalganglion • Schwache cytoplasmatische Färbung in der Mantelzone

Tabelle 29. Expressionsmuster von GATA-2, -3 und -4 im Gehirn von Mausembryonen in den Entwicklungsstadien E11,5, E14,5 und E18,5.

	GATA-2	GATA-3	GATA-4
E11,5	<ul style="list-style-type: none"> • In den cranialen Schnittebenen Kernfärbung in der Ventrikular- und Mantelzone • In caudalen Schnittebenen Kernfärbungen im Trigeminalganglion und in der Mantelzone des Rautenhirns 	<ul style="list-style-type: none"> • Kernfärbung in mehreren Zellnestern in der Mantelzone des Rauten-, Mittel- und Vorderhirns 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytoplasmatische Färbung in der Bodenplatte des Rautenhirns • schwache cytoplasmatische Färbung im Vorderhirn
E14,5	<ul style="list-style-type: none"> • Kernfärbung einzelner Zellen im Mittel- und Vorderhirn (Decken- und Bodenplatte des Mittelhirns, Dienzephalon, Striatum) 	<ul style="list-style-type: none"> • Kernfärbung in mehreren Inseln der Mantelzone des Mittel- und Vorderhirns (Hypothalamus) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nicht detektierbar
E18,5	<ul style="list-style-type: none"> • Kernfärbung einzelner Zellen im Mittelhirn, weniger im Vorderhirn 	<ul style="list-style-type: none"> • Kernfärbung einzelner Zellen im Mittelhirn und im Pons 	<ul style="list-style-type: none"> • Nicht detektierbar

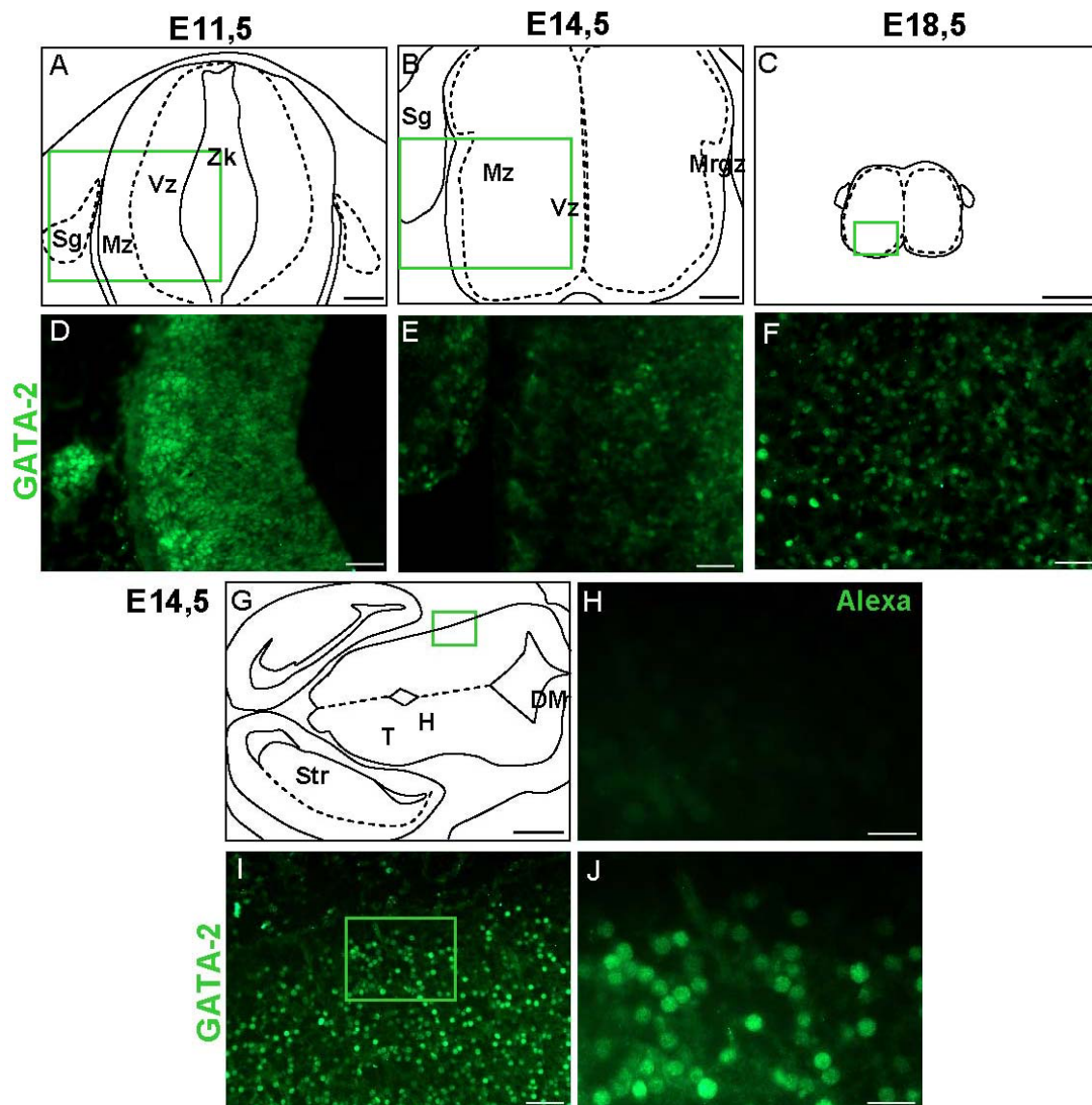


Abbildung 7. GATA-2 Expression (grün) im Rückenmark und Gehirn der sich entwickelnden Maus. Antikörper: GATA-2 goat polyclonal antibody (C-20, Santa Cruz) + Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (MoBiTec). Die grünen Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. (A-F) Rückenmark, E11,5-E18,5; Schnittorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral; Mrgz = Marginalzone, Mz = Mantelzone, Sg = Spinalganglion, Vz = Ventrikularzone, Zk = Zentralkanal. (G-J) Mittel- und Vorderhirn, E14,5; Schnittorientierung: rechter Bildabschnitt = dorsal, linker Bildabschnitt = ventral; DM = Deckplatte des Mittelhirns, H = Hypothalamus, Str = Striatum, T = Thalamus. Maßstabsbalken: (A, B) 100 µm, (C, G) 500 µm, (D-F, I) 50 µm, (H, J) 20 µm.

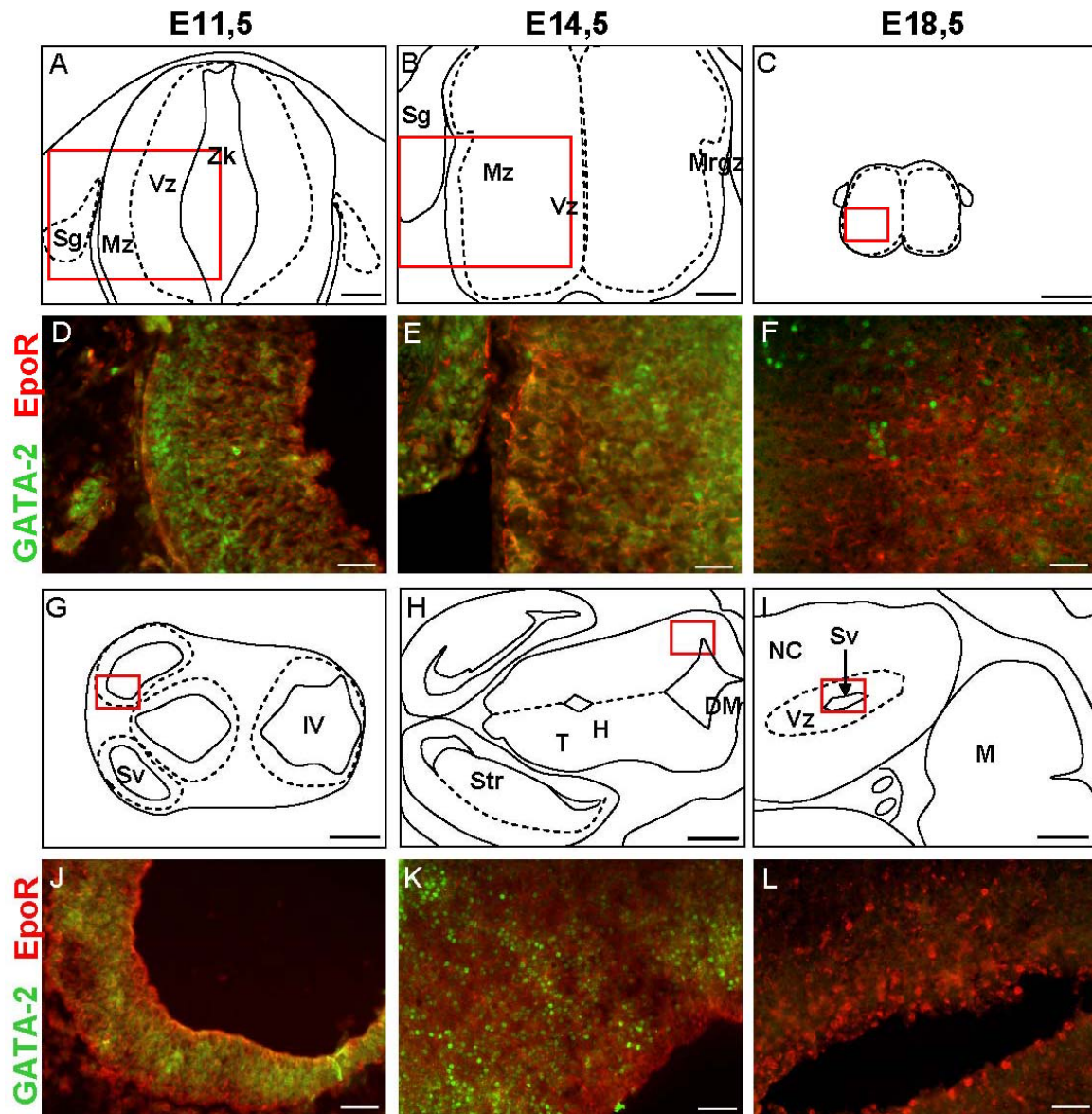


Abbildung 8. Co-Lokalisation von EpoR (rot) und GATA-2 (grün) im Rückenmark und Gehirn der sich entwickelnden Maus (E11,5-E18,5). Antikörper: Antikörper: EpoR rabbit polyclonal antibody (M-20, Santa Cruz) + CyTM 3-conjugated donkey anti-rabbit IgG, GATA-2 goat polyclonal antibody (C-20, Santa Cruz) + Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (MoBiTec). Die roten Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. (A-F) Rückenmark; Schnittorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral. (G-L) Gehirn; Schnittorientierung: rechter Bildabschnitt = dorsal, linker Bildabschnitt = ventral; DM = Deckplatte des Mittelhirns, H = Hypothalamus, M = Mittelhirn, Mrgz = Marginalzone, Mz = Mantelzone, NC = *neopallial cortex* (späterer Cortex), Sg = Spinalganglion, Str = Striatum, Sv = Seitenventrikel, T = Thalamus, Vz = Ventrikularzone, IV = Vierter Ventrikel, Zk = Zentralkanal. Maßstabsbalken: (A, B) 100 μ m, (C, G-I) 500 μ m, (D-F, J-L) 50 μ m.

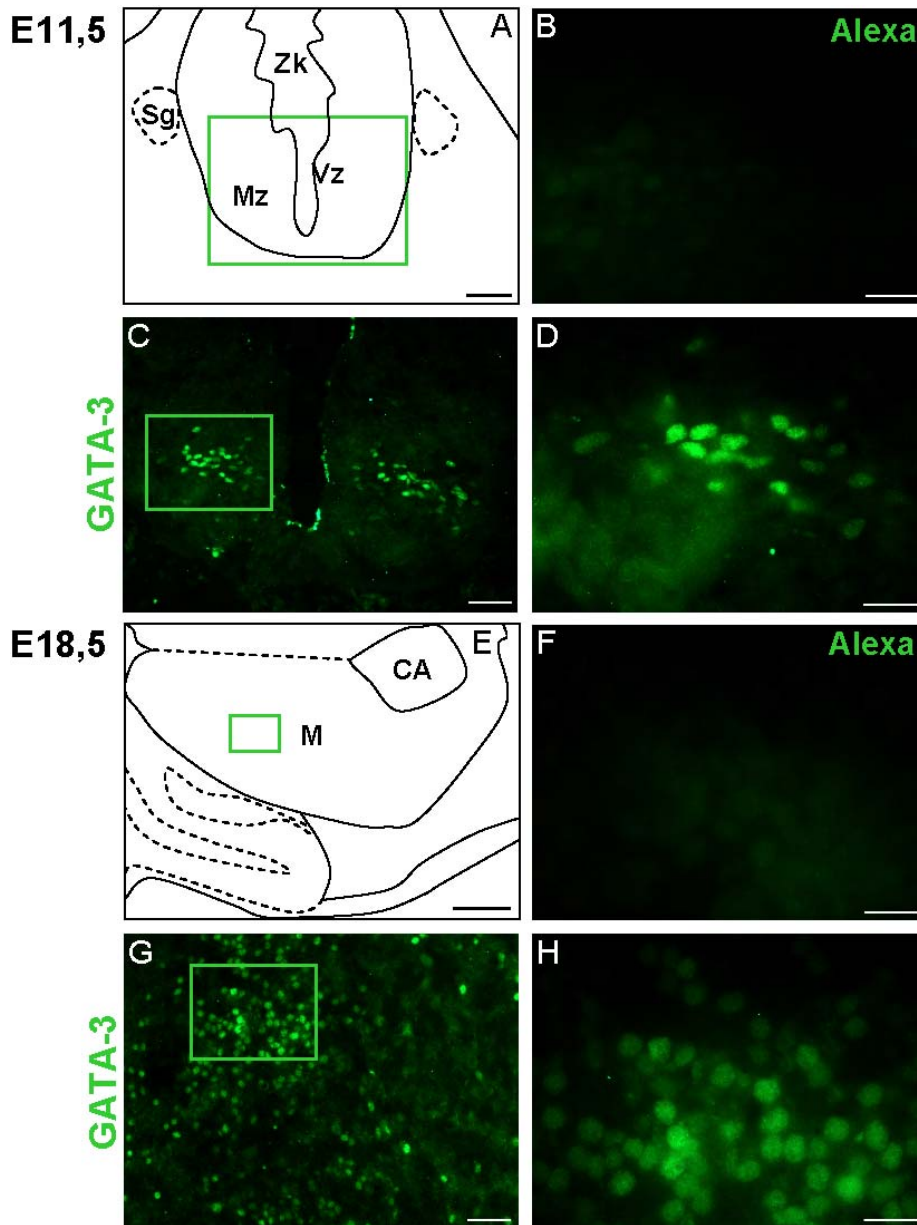


Abbildung 9. GATA-3 Expression (grün) im Rückenmark und Gehirn der sich entwickelnden Maus. Antikörper: GATA-3 goat polyclonal antibody (Santa Cruz) + Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (MoBiTec). Die grünen Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. (A-D) Rückenmark, E11,5; Schnittorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral; Mz = Mantelzone, Sg = Spinalganglion, Vz = Ventrikularzone, Zk = Zentralkanal. (E-H) Mittelhirn, E18,5; Schnittorientierung: rechter Bildabschnitt = dorsal, linker Bildabschnitt = ventral; CA = cerebraler Aquädukt, M = Mittelhirn. Maßstabsbalken: (A) 100 µm, (B, D, F, H) 20 µm, (C, G) 50 µm, (E) 500 µm.

GATA-3 wurde in allen drei Entwicklungsstadien nur in Zellkernen von bestimmten Zellen im ventralen Teil der Mantelzone des Rückenmarks exprimiert (E11,5 siehe Abbildung 9, A-D), wobei am Tag E18,5 nur noch sehr wenige Zellen GATA-3 exprimierten. Im Gehirn wurde GATA-3 ebenfalls nur in spezifischen Zellpopulationen nachgewiesen. Während im Entwicklungsstadium E11,5 mehrere Inseln mit GATA-3 exprimierenden Zellen in der Mantelzone des gesamten Gehirns gefunden wurden, beschränkte sich die Expression später auf Areale im Mittel- und Vorderhirn (E14,5) bzw. im Mittelhirn und im Pons (E18,5, Abbildung 9, E-H).

Die GATA-3 exprimierenden Zellen zeigten – abgesehen von Gehirn im Entwicklungsstadium E18,5 – in allen Bereichen eine Doppelfärbung mit dem EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG (für Rückenmark, E11,5 und Gehirn E14,5: Abbildung 10).

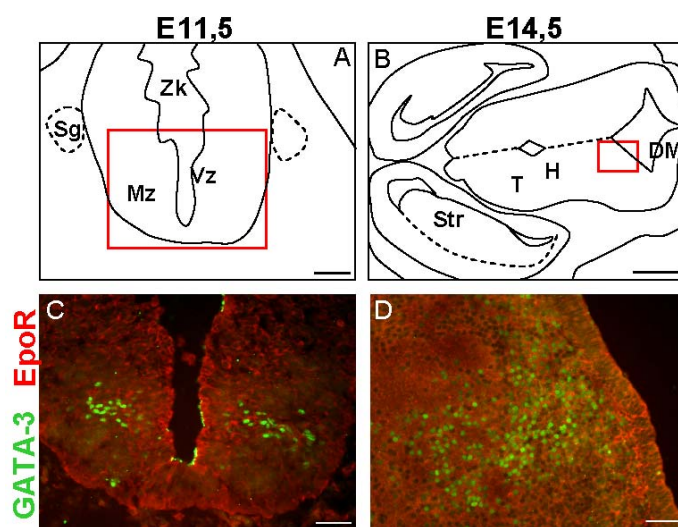


Abbildung 10. Co-Lokalisation von EpoR (rot) und GATA-3 (grün) im Rückenmark und Gehirn der sich entwickelnden Maus. Antikörper: EpoR rabbit polyclonal antibody (M-20, Santa Cruz) + CyTM 3-conjugated donkey anti-rabbit IgG, GATA-3 goat polyclonal antibody (Santa Cruz) + Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (MoBiTec). Die roten Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. (A, C) Rückenmark, E11,5; Schnitorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral; Mz = Mantelzone, Sg = Spinalganglion, Vz = Ventrikularzone, Zk = Zentralkanal. (B, D) Mittel- und Vorderhirn, E14,5; Schnitorientierung: rechter Bildabschnitt = dorsal, linker Bildabschnitt = ventral; DM = Deckplatte des Mittelhirns, H = Hypothalamus, Str = Striatum, T = Thalamus. Maßstabsbalken: (A) 100 μ m, (B) 500 μ m, (C, D) 50 μ m.

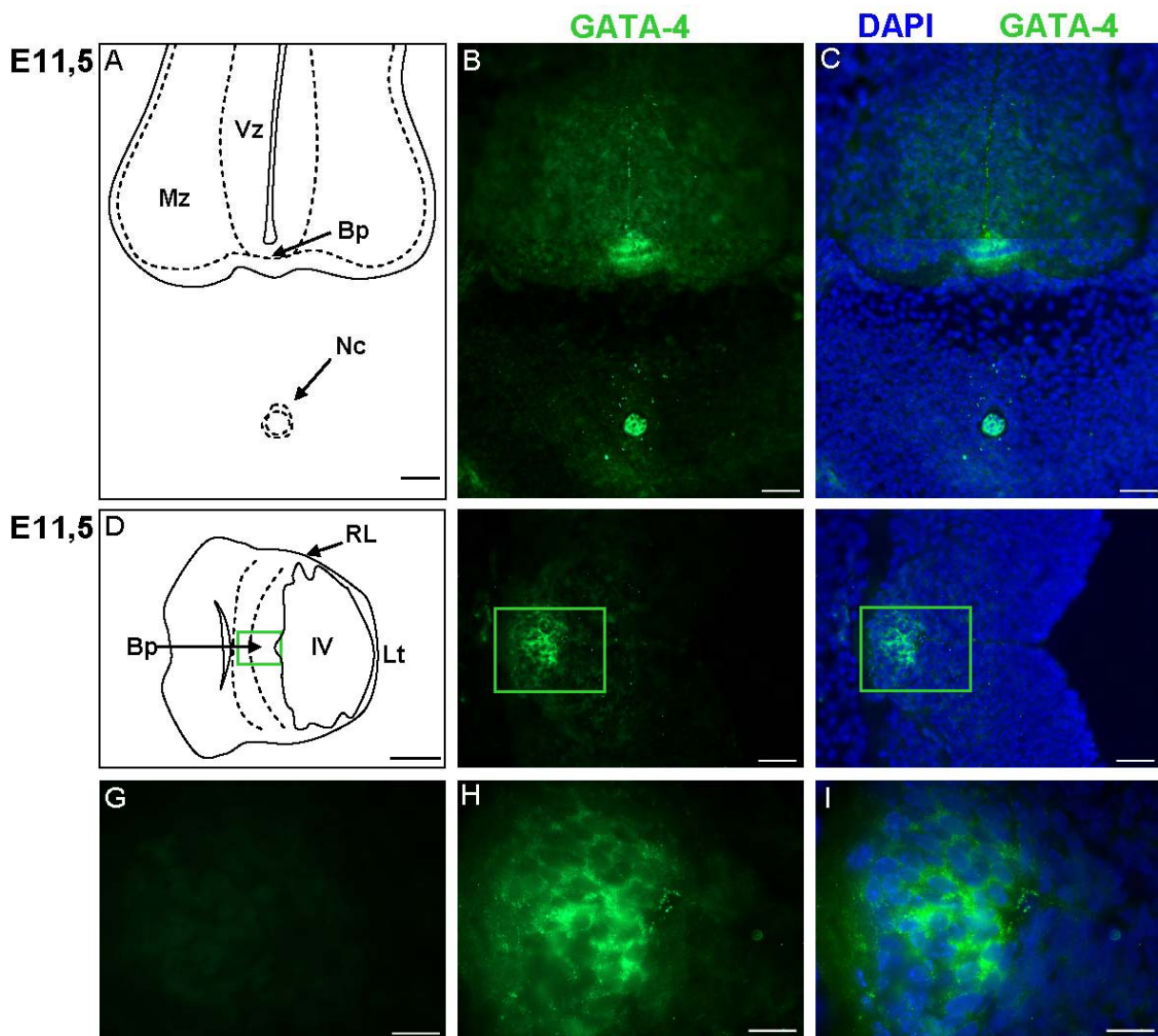


Abbildung 11. GATA-4 Expression (grün) im Rückenmark und Gehirn der sich entwickelnden Maus (E11,5). Antikörper: GATA-4 goat polyclonal antibody (Santa Cruz) + Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (MoBiTec). Die grünen Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. (A-C) Rückenmark; Schnittorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral; Bp = Bodenplatte, Mz = Mantelzone, Nc = Notochord, Vz = Ventrikularzone. (D-I) Rautenhirn; Schnittorientierung: rechter Bildabschnitt = dorsal, linker Bildabschnitt = ventral; Lt = Lamina terminalis, RL = Rhombische Lippe, IV = IV. Ventrikel. Maßstabsbalken: (A-C, E, F) 50 μ m, (D) 500 μ m, (G-I) 20 μ m.

Im Gegensatz zu GATA-2 und GATA-3, die in den Zellkernen lokalisiert waren, konnte GATA-4 in den Entwicklungsstadien E11,5-E18,5 nicht in Zellkernen nachgewiesen werden.

Eine cytoplasmatische GATA-4 Färbung fand sich in der Bodenplatte des Rückenmarks und im Notochord am Tag E11,5 (Abbildung 11, A-C) sowie während der späteren Entwicklung (E14,5 und E18,5) in der Ependymalzone und in den Spinalganglien. GATA-4 wurde am Tag E11,5 in der Bodenplatte (Abbildung 11, D-I) und im Notochord bis hin zum Rautenhirn exprimiert. Im Vorderhirn fand sich eine schwache cytoplasmatische GATA-4 Expression. In späteren Entwicklungsstadien (E14,5 und E18,5) war GATA-4 im ZNS nicht mehr nachweisbar. Einige der GATA-4 exprimierenden Zellen in der Bodenplatte zeigten eine Doppelfärbung mit dem EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG (nicht gezeigt).

4.1.3 Sp1

Der Transkriptionsfaktor Sp1 zeigte ebenfalls eine entwicklungs- und zelltypspezifische Expression im ZNS der Maus (Tabelle 30). Sp1-Protein fand sich fast ausschließlich in der Ventrikularzone des sich entwickelnden ZNS (E11,5-E18,5, für Rückenmark Abbildung 12). Auch im Notochord (E11,5) und im Spinalganglion (E11,5-E18,5) wurde Sp1 exprimiert.

Tabelle 30. Expressionsmuster von Sp1 im Rückenmark von Mausembryonen in den Entwicklungsstadien E11,5, E14,5 und E18,5.

	Rückenmark	Gehirn
E11,5	Kernfärbung in der Ventrikularzone sowie im Spinalganglion und Notochord	Kernfärbung im gesamten Neuroepithel
E14,5	Kernfärbung in der Ventrikularzone sowie einzelne Kernfärbungen im Spinalganglion	Starke Kernfärbung in der Ventrikularzone, nur in einzelnen Zellen der übrigen Zonen
E18,5	Kernfärbung in der Ventrikular- und dorsalen Marginalzone sowie im Spinalganglion	Kernfärbung in der Ventrikularzone, nur in einzelnen Zellen der übrigen Zonen

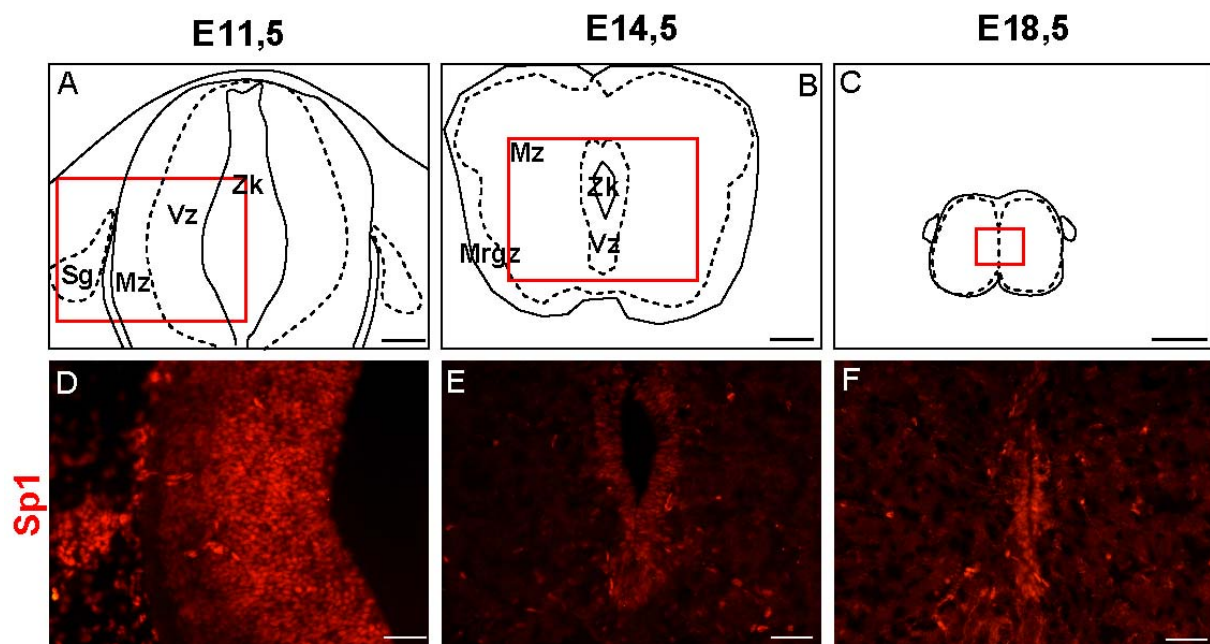


Abbildung 12. Sp1-Expression (rot) im Rückenmark der sich entwickelnden Maus (E11,5-E18,5). Antikörper: Sp1 rabbit polyclonal IgG (PEP 2, Santa Cruz) + CyTM 3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Inc.). Die roten Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. Schnittorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral; Mrgz = Marginalzone, Mz = Mantelzone, Sg = Spinalganglion, Vz = Ventrikularzone, Zk = Zentralkanal. Maßstabsbalken: (A, B) 100 µm, (C) 500 µm, (D-F) 100 µm.

Um Co-Lokalisationen mit den GATA-Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden Doppelfärbungen durchgeführt. GATA-2 co-lokalisierte mit Sp1 am Tag E11,5 in Zellkernen der Ventrikularzone sowohl im Rückenmark (Abbildung 13) als auch im Gehirn. In der späteren Entwicklung färbten sich nur wenige Zellkerne mit beiden Transkriptionsfaktoren in der Ventrikularzone des Mittelhirns an (E14,5). Die Co-Lokalisation im Gehirn am Tag E18,5 der Entwicklung wurde nicht untersucht. Am Tag E11,5 wiesen einige der GATA-3 exprimierenden Zellen im Rückenmark und Gehirn ebenfalls eine Sp1-Expression auf. In späteren Stadien konnte aber keine Co-Lokalisation nachgewiesen werden. Die Co-Lokalisation im Gehirn am Tag E14,5 wurde nicht untersucht. Auf die Untersuchung der Co-Lokalisation von Sp1 mit GATA-4 wurde verzichtet, da GATA-4 immunhistochemisch nicht im Zellkern detektiert werden konnte.

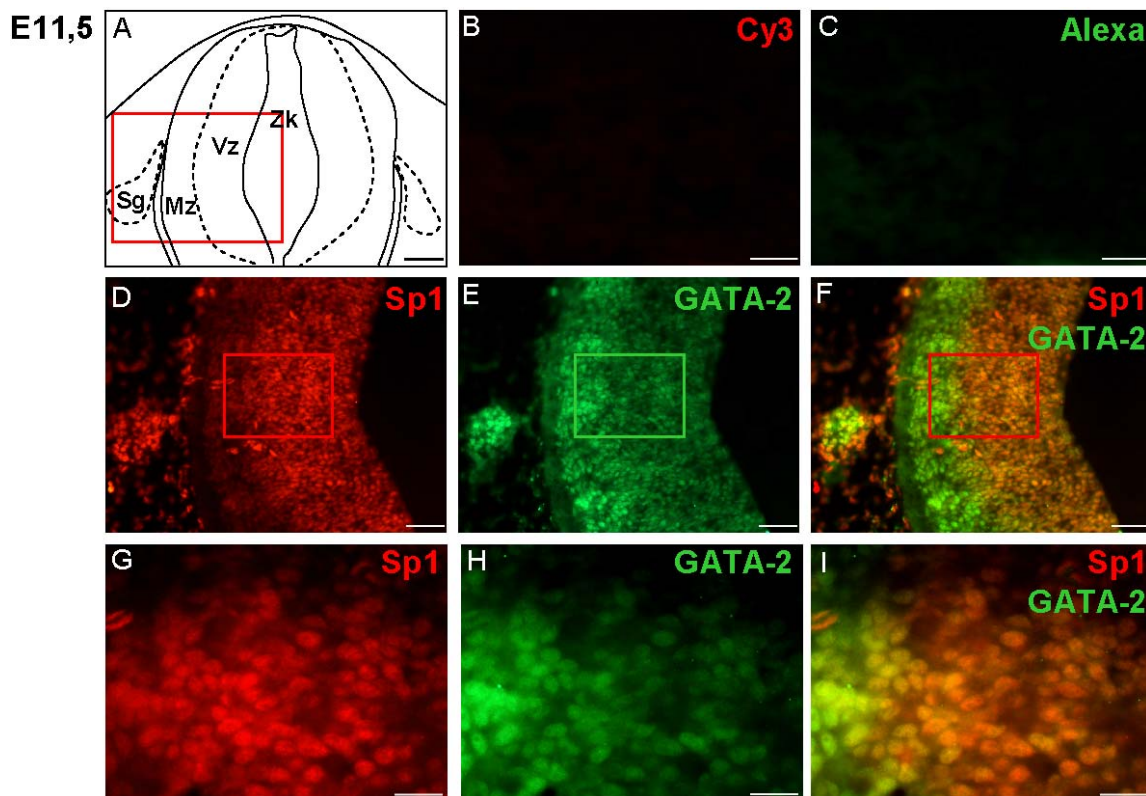


Abbildung 13. Co-Lokalisation (orange) von Sp1 (rot) und GATA-2 (grün) im Rückenmark der sich entwickelnden Maus (E11,5). Antikörper: Sp1 rabbit polyclonal IgG (PEP 2, Santa Cruz) + CyTM 3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Inc.), GATA-2 goat polyclonal antibody (C-20, Santa Cruz) + Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG (MoBiTec). Die roten bzw. grünen Rechtecke kennzeichnen die nachfolgend vergrößerten Bildausschnitte. Schnittorientierung: oberer Bildabschnitt = dorsal, unterer Bildabschnitt = ventral; Mz = Mantelzone, Sg = Spinalganglion, Vz = Ventrikularzone, Zk = Zentralkanal. Maßstabsbalken: (A) 100 μ m, (B, C, G-I) 20 μ m, (D-F) 50 μ m.

Die immunhistologische Untersuchung des Rückenmarks und Gehirns der sich entwickelnden Maus zeigte die Expression des EpoR sowie der Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3, -4 und Sp1. GATA-4 wurde in den untersuchten Entwicklungsstadien (E11,5-E18,5) nur im Cytoplasma der Zellen detektiert. Doppelfärbungen wiesen auf eine Co-Lokalisation von EpoR und den GATA-Faktoren sowie von Sp1 und GATA-2 bzw. GATA-3 in einigen Zellen des Rückenmarks und Gehirns der sich entwickelnden Maus hin.

4.2 Expression der mRNA von *GATA-2*, *-3*, *-4* und *EpoR* in unterschiedlichen Arealen des humanen fetalen Nervensystems

Um einen weiteren Hinweis auf eine Co-Expression von *EpoR* und den GATA-Transkriptionsfaktoren im ZNS zu erhalten, wurde ihre mRNA-Expression in humanen fetalen Geweben in der 23. und 35. Woche pc untersucht. Zum Vergleich des Expressionsniveaus wurde das *house keeping*-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) amplifiziert.

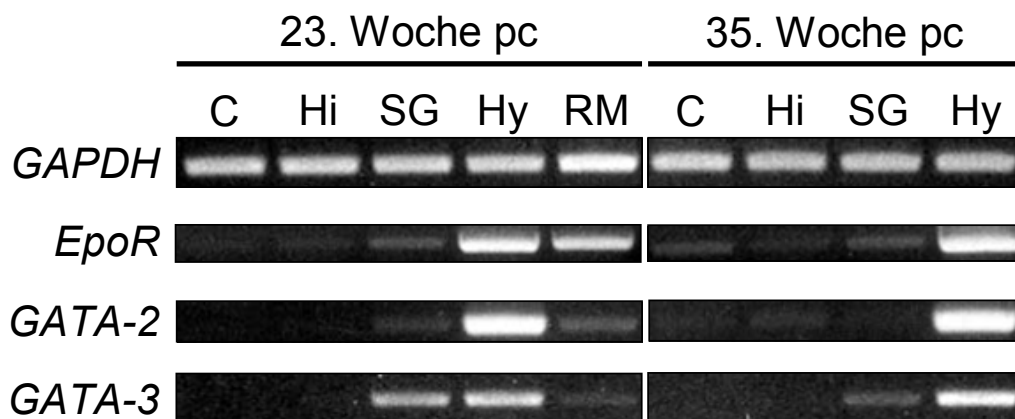


Abbildung 14. RT-PCR-Analyse der Expression von *EpoR*, *GATA-2* und *-3* in verschiedenen Arealen des humanen Gehirns sowie der Hypophyse im Gestationsalter von 23 und 35 Wochen pc. C = Cortex, Hi = Hippocampus, Hy = Hypophyse, RM = Rückenmark, SG = Stammganglien. Zyklen: *GAPDH* = 30x, *EpoR*/*GATA-2*/*GATA-3* = 35x.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, fand sich eine schwache *EpoR*-Expression im Cortex, im Hippocampus und in den Stammganglien in der 23. und 35. Woche pc, sowie eine stärkere Expression im Rückenmark und in der Hypophyse in der 23. Woche pc. Eine schwache *GATA-2* mRNA-Expression konnte in den Stammganglien und im Rückenmark in der 23. sowie im Cortex und im Hippocampus in der 35. Woche pc detektiert werden, während die Hypophyse zu beiden Zeitpunkten viel *GATA-2* mRNA aufwies. Eine schwache *GATA-3*

Expression wurde im Rückenmark und in den Stammganglien (23. bzw. 35. Woche pc) sowie eine stärkere Expression in den Stammganglien aus der 23. Woche pc sowie in der Hypophyse zu beiden Zeitpunkten gezeigt. Daraus lässt sich folgern, dass der *EpoR* mit *GATA-2* und *-3* in den Stammganglien, im Rückenmark und der Hypophyse co-exprimiert wurde. Es war leider nicht dokumentiert, ob die cDNA aus der Adeno- und/oder der Neurohypophyse isoliert wurde.

Es fällt auf, dass in Gewebeproben mit einer höheren *EpoR* mRNA-Expression auch mehr *GATA-2* und/oder *GATA-3* mRNA nachgewiesen wurden. Die *GATA-4* Expression wurde ebenfalls untersucht, konnte aber nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Untersuchung zeigte eine Co-Expression von *EpoR* und *GATA-2* bzw. *-3* – aber nicht *GATA-4* – in einigen Regionen des sich entwickelnden humanen Nervensystems.

4.3 Screening von Zelllinien mit neuronalem Phänotyp auf die Expression von GATA-Transkriptionsfaktoren, Epo und EpoR

Für die Analyse der transkriptionellen Regulation des *EpoR*-Gens im ZNS mit molekularbiologischen Methoden musste ein zelluläres Modellsystem etabliert werden. Dafür wurden zunächst vier Zelllinien mit neuronalem Phänotyp (SH-SY5Y, NT2, Kelly und SK-N-AS) mittels RT-PCR auf die Co-Expression des *EpoR*, *Epo* und der *GATA*-Transkriptionsfaktoren untersucht.

Epo und *EpoR* wurden in allen untersuchten Zelllinien exprimiert. *GATA-2*, *-3*, *-4* und *-6* konnten jeweils mit speziellen Expressionsmustern in den Zelllinien nachgewiesen werden, während weder *GATA-1* noch *GATA-5* in Zellen mit neuronalem Phänotyp exprimiert wurden (Tabelle 31). Das Muster der Protein-Expression stimmte mit dem der mRNA-Expression überein (Daten nicht gezeigt), wobei die Transkriptionsfaktoren im Zellkern-Extrakt und *Epo* sowie *EpoR* im Ganzzell-Extrakt nachgewiesen wurden.

Tabelle 31. Expression der mRNA von *EpoR*, *Epo* und den sechs *GATA*-Transkriptionsfaktoren in humanen Zelllinien mit neuronalem Phänotyp.

Gen	SH-SY5Y	SK-N-AS	NT2	Kelly
<i>Epo</i>	+	+	+	+
<i>EpoR</i>	+	+	+	+
<i>GATA-1</i>	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>GATA-2</i>	+	+	+	+
<i>GATA-3</i>	+	+	+	+
<i>GATA-4</i>	+	+	neg.	neg.
<i>GATA-5</i>	neg.	neg.	neg.	neg.
<i>GATA-6</i>	neg.	+	+	+

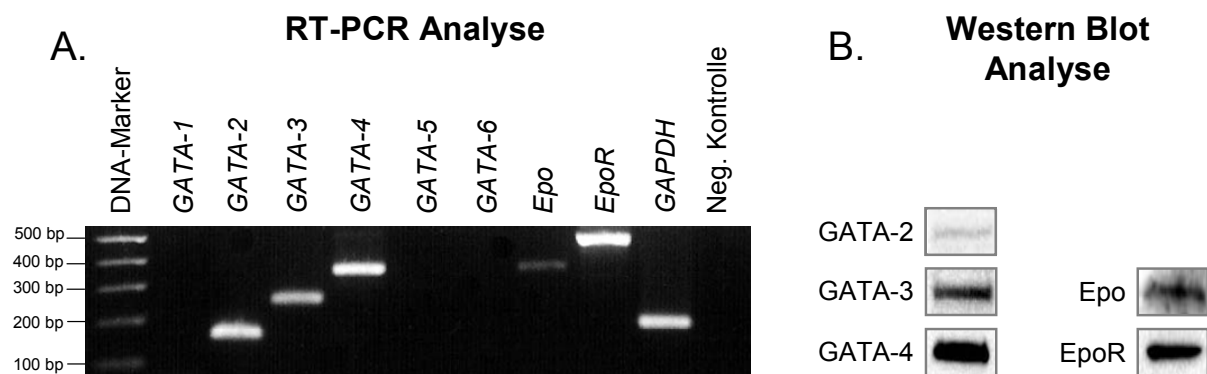


Abbildung 15. Expression von *Epo*, *EpoR*, *GATA-1* bis -6 und *GAPDH* in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y. (A) RT-PCR. 33 Zyklen, Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarose-Gel. (B) Western Blot Analyse. Je 12 µg Protein aus Kernprotein- (*GATA-2*, -3, -4) bzw. Ganzzellprotein-Extrakten (*Epo*, *EpoR*), aufgetrennt in einem 4-20%-igen Tris-Glycin-Gel (Invitrogen). Der für den Nachweis des *EpoR* verwendete Antikörper (*EpoR* (C-20) rabbit polyclonal IgG) zeigte eine Bande in der erwarteten Größe von 66 kDa.

Die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y, die neben Epo und EpoR auch GATA-2, -3 und -4 exprimiert (Abbildung 15), wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Andere Arbeitsgruppen haben diese Zelllinie bereits als Model für neuronale Zelldifferenzierung [118], für Studien zur Neuroprotektion durch rEpo [119, 120], sowie zur Untersuchung der *Epo*-Genexpression in neuronalen Zellen unter Hypoxie verwendet [121].

4.4 In vitro-Nachweis der Bindung von GATA-2, -3 und -4 an die 5'-flankierende Region des *EpoR*

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) diente dem *in vitro*-Nachweis der Bindung von GATA-Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen in der 5'-flankierenden Region des *EpoR*.

Es wurden für alle in Abbildung 3 dargestellten potentiellen GATA-Bindungsstellen (in Position -1487, -520, -487, -271, -44, und +133 relativ zur Transkriptionsstartstelle) 30 bp-lange Oligonukleotide synthetisiert (Tabelle 13). Die ³²P-markierten Oligonukleotide wurden mit Kernproteinen aus SH-SY5Y-Zellen inkubiert, wobei es zur Ausbildung von Retardationsbanden im Gel kam (Abbildung 16, Spalte 2). Während die Komplexe nach der Inkubation mit einem Wildtyp-Kompetitor im Überschuss abgeschwächt wurden (Spalte 3), blieb ein deutlicher Protein-DNA-Komplex nach Inkubation mit einem Kompetitor, in dem die GATA-Bindungsstelle mutiert war, erhalten (Spalte 4). Dies weist auf eine Komplexbildung an der GATA-Bindungsstelle hin. Um zu zeigen, ob einer der exprimierten GATA-Transkriptionsfaktoren an die DNA bindet, wurden die DNA-Protein-Komplexe mit spezifischen Antikörpern gegen GATA-2, -3, -4 oder -6 (letzteres als Kontrolle der Spezifität) inkubiert (Spalten 5-8), wobei eine Bindung zum Supershift oder zur Konkurrenz der Bande im Gel führt. So konnte die Bindung von GATA-2, -3 und -4 an die Bindungsstelle in Position -271 (Teil A), sowie von GATA-3 und -4 in Position -44 (Teil B) relativ zur Transkriptionsstartstelle des *EpoR*-Gens nachgewiesen werden. An den GATA-Bindungsstellen in Position -520, -487, -1487 und +133 fand sich keine Bindung der GATA-Transkriptionsfaktoren (Daten nicht gezeigt).

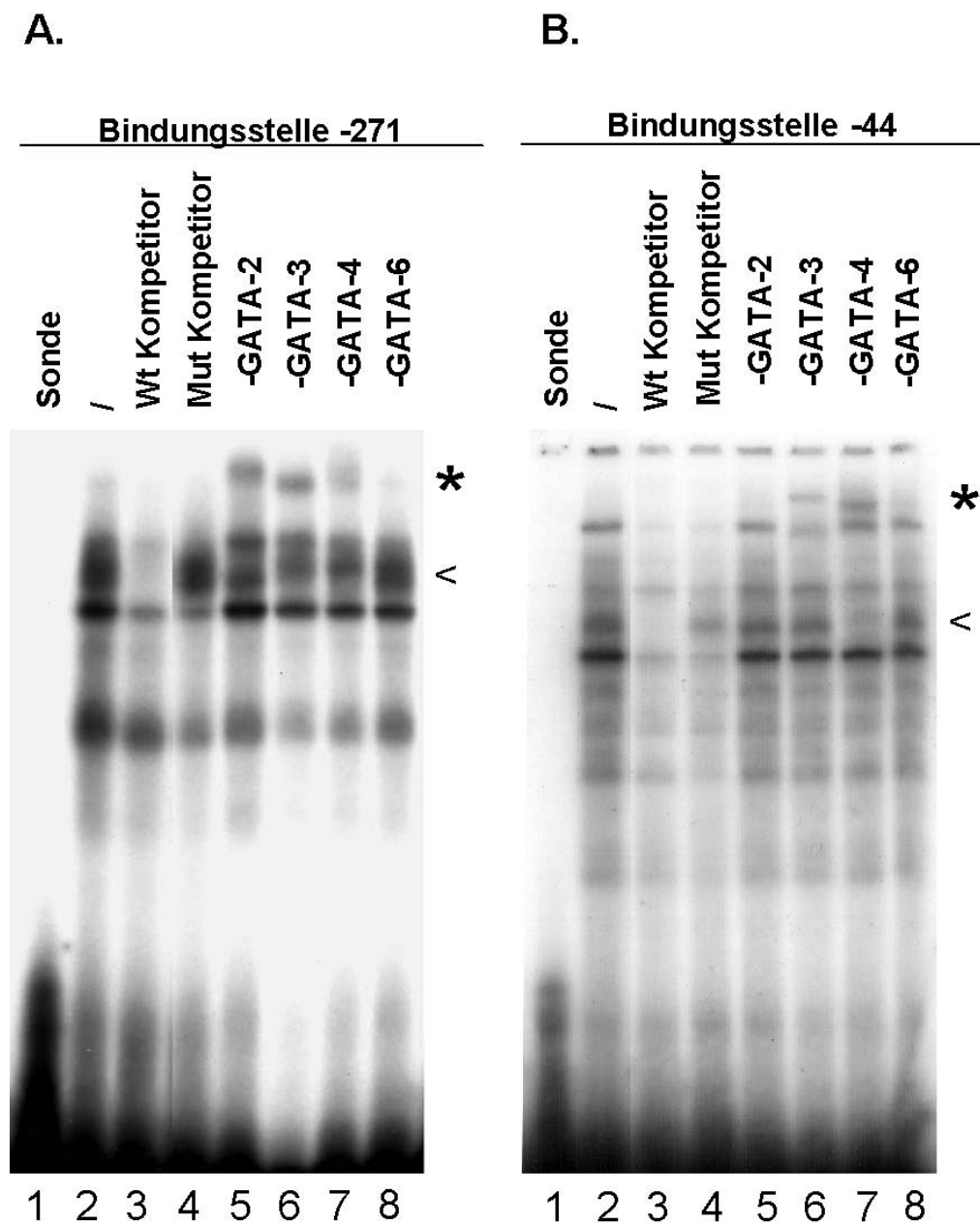


Abbildung 16. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zum Nachweis der Bindung von GATA-Transkriptionsfaktoren an zwei Abschnitte der 5'-flankierenden Region des humanen *EpoR*-Gens: (A) Bindungsstelle -271 und (B) Bindungsstelle -44 relativ zur Transkriptionsstartstelle. Die Inkubation der Sonde mit nukleären Proteinextrakten aus SH-SY5Y Zellen resultierte in einer spezifischen Retardationsbande (>). Nach der Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen die GATA-Transkriptionsfaktoren entstanden Supershifts durch Bildung von Komplexen mit geringer Mobilität (*). Auftrennung in einem 5%-igen nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel, Visualisierung der Komplexe durch Autoradiographie.

Mittels EMSA wurde gezeigt, dass GATA-2, -3 und -4 unter *in vitro*-Bedingungen eine spezifische Bindung an die 5'-flankierende Region des humanen *EpoR*-Gens zeigen. Alle drei Faktoren binden in Position -271, während an den minimalen Promotor (in Position -44), wo in hämatopoietischen Zellen die Bindung von GATA-1 gezeigt wurde, nur GATA-3 und -4 binden.

4.5 Reportergen-Assays

Die funktionelle Bedeutung der *in vitro*-Bindung der GATA-Transkriptionsfaktoren an die 5'-flankierenden Region des *EpoR* wurde nachfolgend mit Reportergen-Assays analysiert. Dafür wurden unterschiedliche Fragmente der 5'-flankierenden Region des *EpoR*-Gens in einen promotorlosen Luziferase-Vektor kloniert (pGL2-Basic). Anschließend wurde die basale Aktivität dieser Konstrukte in Reportergen-Assays untersucht. Die dabei gemessene Luziferase-Aktivität entsprach der regulatorischen Aktivität der untersuchten Fragmente, die über die in der Zelle funktionell aktiven Transkriptionsfaktoren vermittelt wurde. In einem zweiten Set von Experimenten wurden dann sowohl die GATA-Transkriptionsfaktoren als auch Sp1 überexprimiert. Durch diese Reportergen-Assays konnte die funktionelle Bedeutung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren bei der *EpoR*-Regulation näher charakterisiert werden.

4.5.1 Klonierung und Mutagenese der Konstrukte

Die Analysen konzentrierten sich auf die Region -449 bis +33 relativ zur Transkriptionsstartstelle, die die GATA-Bindungsstellen in Position -271 und -44 enthält, da an diesen Positionen im EMSA eine Bindung von GATA-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte (Abbildung 16). Bei der Sequenzanalyse mit TRANSFAC Professional fiel auf, dass beide GATA-Bindungsstellen in ihrer unmittelbaren Nähe Cluster von Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren aufweisen. Dazu gehören Bindungsmotive für Sp1, HNF-3 α/β und Ets-2, die wegen ihrer potentiellen Bedeutung für die transkriptionelle Regulation des *EpoR* in

die Untersuchungen miteinbezogen wurden (Abbildung 17). Diese Transkriptionsfaktoren werden in SH-SY5Y Zellen exprimiert, was an späterer Stelle gezeigt wird.

Die Fragmente -449/+33, -449/-249, -75/+33 und +202/+441 wurden aus genomischer DNA amplifiziert, während die Deletionsmutanten -449/-316 und -449/-301 nachfolgend aus dem Konstrukt -449/-249 amplifiziert wurden. Das Konstrukt +202/+441, das ein Fragment aus der kodierenden Region des *EpoR*-Gens trägt, diente als Kontrolle.

Mittels OE-PCR wurden folgende Mutanten hergestellt: GATA mut -271 (GATA zu AAAA) und Sp1 mut -300 (GGCTGGG zu AAAAGGG) aus -449/-249; GATA mut -44 (TATC zu CCCC), Sp1 mut -17 (GCCCCGCCCC zu GCCCCGAAAA) und Ets-2 mut +19 (GGGAAGG zu TTTAAGG) aus -75/+33.

4.5.2 Basale Aktivität von Fragmenten aus der 5'-flankierenden Region des *EpoR*-Gens

Abbildung 17 fasst die Untersuchung der basalen Aktivitäten der *EpoR*-Reportergen-Konstrukte zusammen. Für jede Versuchsbedingung wurden fünf unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Das erste Konstrukt umfasste die gesamte Region von Nukleotid -449 bis +33 (blauer Balken). Die nächste Gruppe von sieben Konstrukten konzentrierte sich auf die Region von Nukleotid -449 bis -188, die die GATA-Bindungsstelle in Position -271 enthält (hellgraue Balken). Die folgende Gruppe von vier Konstrukten analysierte die Region von Nukleotid -75 bis +33, welche die GATA-Bindungsstelle in Position -44 (dunkelgraue Balken) enthält. Der schwarze Balken repräsentiert die Aktivität des Kontroll-Vektors (+202/+441), die *per definitionem* = 1 gesetzt wurde. Die gemessenen RLUs der *Firefly* Luziferase wurden durch die RLUs der *Renilla* Luziferase dividiert, um die Transfektionseffizienz zu normalisieren.

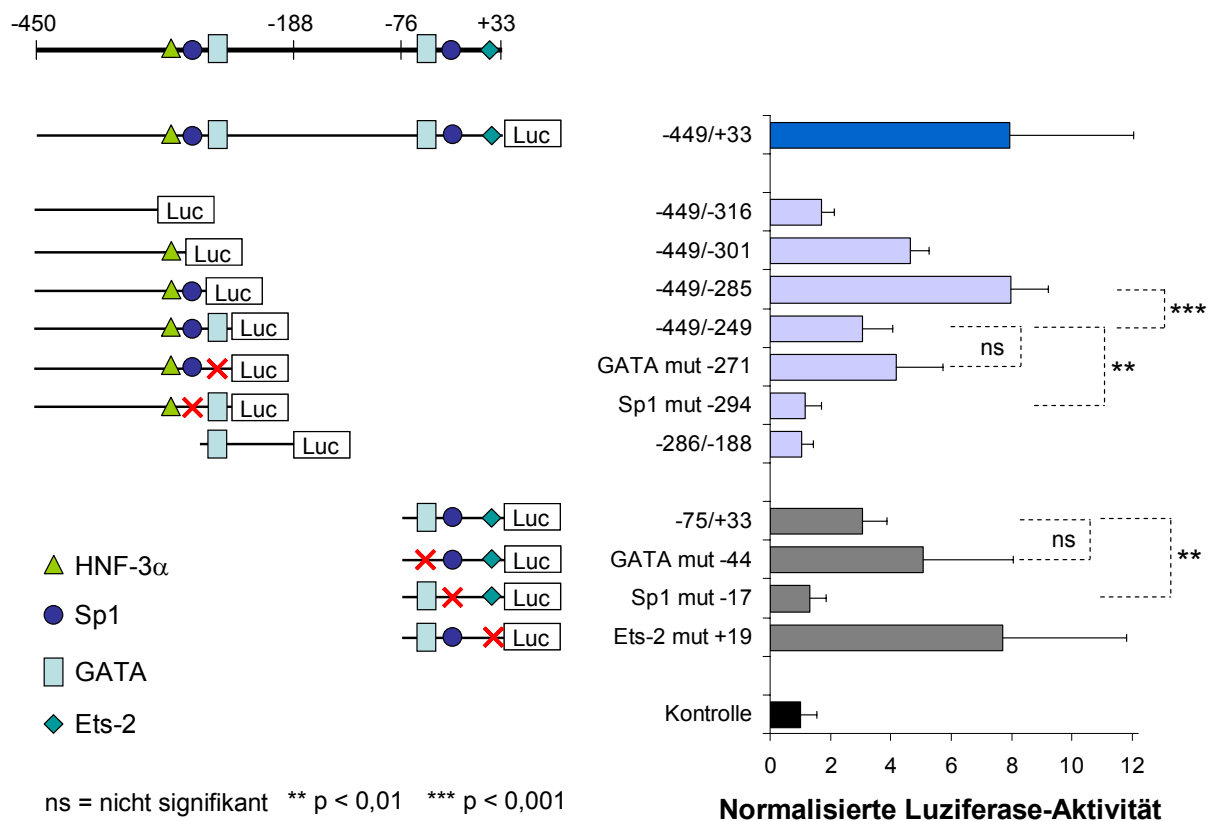


Abbildung 17. Basale Aktivität von unterschiedlichen Fragmenten aus der 5'-flankierenden Region des *EpoR*-Gens. Für die Region -450 bis +33 relativ zur Transkriptionsstartstelle, die in Position -271 und -44 zwei GATA-Bindungsstellen enthält, wurden verschiedene Reporter-gen-Konstrukte hergestellt. Die Bindungsstellen für relevante Transkriptionsfaktoren sind mit unterschiedlichen Symbolen markiert. Das rote X weist auf die Mutation einer Bindungsstelle hin. In der rechten Bildhälfte sind Reporter-gen-Assays, durchgeführt in SH-SY5Y Zellen mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), dargestellt. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ($0,4 \times 10^6$ Zellen/Well) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit jeweils 1 µg/Well Reporter-gen-Konstrukt und 15 ng/Well phRL-TK transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten nach Normalisierung der Werte auf die basale Aktivität des Kontroll-Vektors, die mit 1 definiert wurde, präsentiert.

Während das Konstrukt -449/-316, dem das gesamte Cluster von Bindungsstellen fehlt, eine ähnliche Aktivität zeigte wie die Kontrolle, nahm die Reporter-Gen-Expression bei erhaltener HNF-3 α / β -Bindungsstelle signifikant zu (-449/-301; 4,6-fach, $p < 0,001$) und noch stärker,

wenn auch die benachbarte Sp1-Bindungsstelle erhalten war (-449/-285; 8-fach, $p < 0,001$). Wurde das Konstrukt aber um die GATA-Bindungsstelle erweitert (-449/-249), ließ sich die Reportergen-Expression im Vergleich zur Kontrolle nur um das 3,1-fache stimulieren ($p < 0,01$). Die Mutation dieser Bindungsstelle (GATA mut -271) erhöhte die Aktivität auf das 4,2-fache der Kontrollaktivität ($\Delta+1,1$ im Vergleich zum Wildtyp, $p = 0,23$). Mutierte man aber im gleichen Abschnitt die Sp1-Bindungsstelle (Sp1 mut -300), fiel die Reportergen-Expression etwa auf das Kontrollniveau ab ($\Delta-1,7$ im Vergleich zum Wildtyp, $p < 0,01$). Ein Konstrukt, das die GATA-Bindungsstelle in Position -272 ohne die benachbarten Sp1 und HNF-3 α Motive enthielt, wies keine Luziferase-Aktivität auf (-286/-188).

Das Konstrukt -75/+33 bewirkte eine 3-fache Aktivierung des Reportergens ($p < 0,01$), die ebenfalls durch eine Mutation der GATA-Bindungsstelle erhöht wurde (GATA mut -44, $p = 0,21$ im Vergleich zum Wildtyp). Mutierte man die Sp1-Bindungsstelle (Sp1 mut -17), fiel die Aktivität wiederum und erreichte das 1,3-fache des Kontrollniveaus ($\Delta-1,7$ im Vergleich zum Wildtyp, $p < 0,05$). Die Mutation des Ets-2 Motives (Ets-2 mut +19) erhöhte die Aktivität auf das 7,7-fache des Kontrollniveaus ($\Delta+3,7$ im Vergleich zum Wildtyp, $p = 0,063$).

Aus diesen Experimenten kann zusammenfassend gefolgert werden, dass in SH-SY5Y Zellen beide Abschnitte des *EpoR*-Gens (-449/-249 und -75/+33) eine basale Aktivität aufweisen, die durch eine Deletion bzw. Mutation der GATA-Bindungsstelle verstärkt wird. Eine Mutation der benachbarten Sp1-Bindungsstelle verhindert jeweils die Aktivierung der Reportergen-Expression, während die Mutation einer Ets-2 Bindungsstelle im -75/+33 Konstrukt zu einer – wenn auch nicht signifikanten – Stimulation führt. Daraus ergeben sich die Hypothesen, dass die Sp1-Bindungsstelle eine aktivierende und die GATA-Motive sowie das Ets-2 Motiv in Position +19 eine inhibierende Wirkung der Bindungspartner vermitteln könnten. Außerdem scheint neben dem minimalen Promotor ein weiter stromaufwärts liegender Abschnitt der 5'-flankierenden Region für die *EpoR*-Expression in neuronalen Zellen relevant zu sein.

4.5.3 Einfluss von GATA-2, GATA-3, GATA-4 und Sp1 auf die Aktivität von Fragmenten aus der 5'-flankierenden Region des *EpoR*-Gens

Der Einfluss der Überexpression von GATA-2, -3, -4 und Sp1 auf die Aktivität der Wildtyp-Konstrukte -449/+33, -449/-249 und -75/+33 ist in Abbildung 18 dargestellt. Es wurden sechs unabhängige Wiederholungen für jede Versuchsbedingung durchgeführt.

Die Aktivität der Konstrukte -449/-249 und -75/+33 ließ sich durch GATA-2, -3 und -4 sowie durch Sp1 im Vergleich zu der Aktivität der mit dem entsprechenden Leervektor co-transfizierten Konstrukte (als 1 definiert, weiße Balken) erhöhen. Das Konstrukt mit dem gesamten Abschnitt -449/+33 ließ sich ebenfalls durch GATA-2, -3 und -4 aktivieren. Für dieses Konstrukt wurden allerdings keine zusätzlichen Versuche mit Sp1 durchgeführt.

GATA-2 aktivierte die drei Konstrukte signifikant um das 1,7- bis 2,6-fache, wobei das Konstrukt mit der gesamten Region (-449/+33) am stärksten und signifikant höher ($p < 0,05$) als das Konstrukt -449/-249 aktiviert wurde. GATA-3 führte zu einer signifikanten Stimulation aller Konstrukte um das 1,6- bzw. 3,4-fache. Hier zeigte das Konstrukt mit dem minimalen Promotor (-75/+33) die stärkste Aktivierung. Diese war auch signifikant höher als die Aktivierung des gesamten Konstruktes ($p < 0,05$) und des Konstruktes -449/-249 ($p < 0,001$), wobei aber kein additiver Effekt erreicht wurde. GATA-4 konnte die drei Konstrukte am stärksten aktivieren (um das 2,3- bis 4,8-fache). Das gesamte Konstrukt -449/+33 und das Konstrukt mit dem minimalen Promotor ließen sich ähnlich stark und beide signifikant stärker als das Konstrukt -449/-249 ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) stimulieren. Sp1 führte zu einer jeweils 1,8-fachen Aktivierung der Konstrukte -449/-249 und -75/+33 ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$).

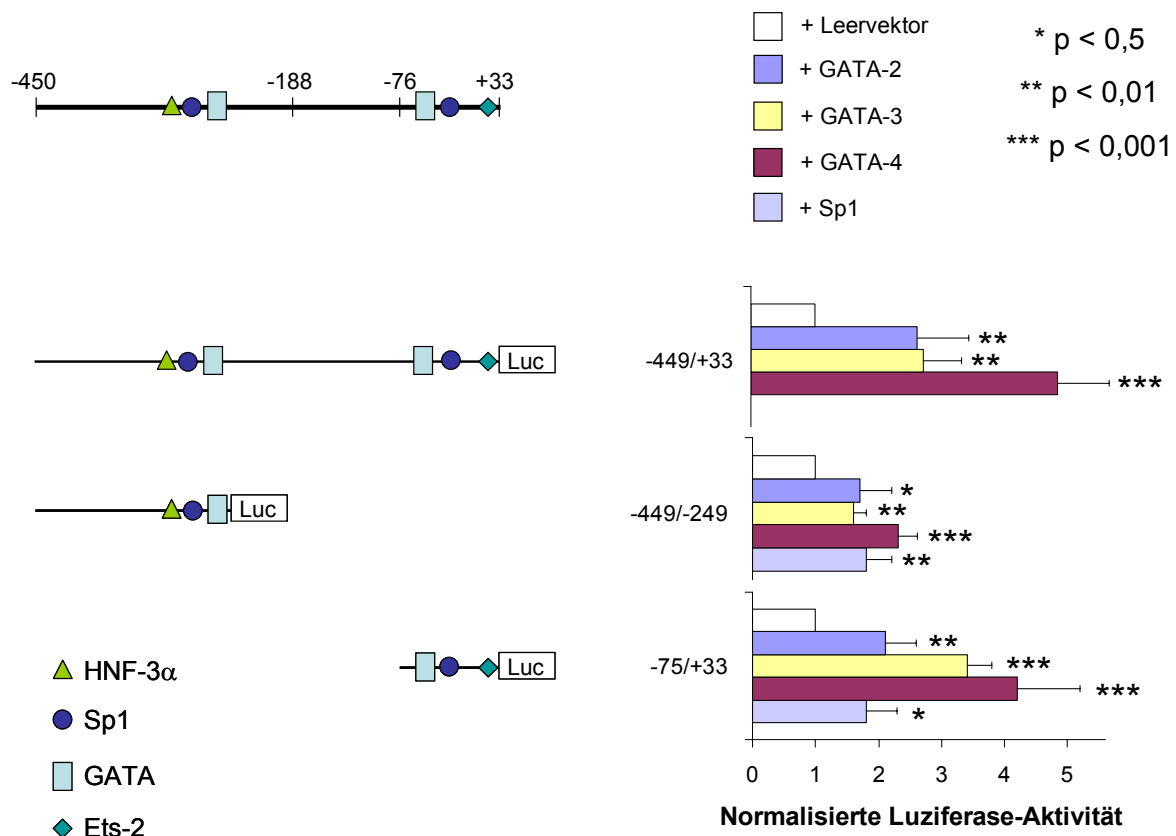


Abbildung 18. Einfluss von GATA-2, -3, -4 und Sp1 auf die Aktivität unterschiedlicher Abschnitte der 5'-flankierenden Region des *EpoR*-Gens. Die untersuchten Fragmente sind graphisch analog zur Abbildung 17 dargestellt. In der rechten Bildhälfte sind die Reporter-Gen-Assays, durchgeführt in SH-SY5Y Zellen mit dem Luciferase Assay System (Promega), zusammengefasst. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ($0,4 \times 10^6$ Zellen/Well) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit jeweils 1 µg/Well Reporter-Gen-Konstrukt und 1 µg/Well Expressionsvektor bzw. Leervektor transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus sechs unabhängigen Experimenten nach Normalisierung der Werte auf die basale Aktivität des jeweiligen Reporter-Gen-Konstruktes, co-transfiziert mit dem entsprechenden Leervektor, präsentiert. Die Angaben zur statistischen Signifikanz beziehen sich jeweils auf den Vergleich „Reporter-Gen-Konstrukt + Expressionsvektor“ zu „Reporter-Gen-Konstrukt + entsprechender Leervektor“.

Die Versuche zeigen, dass die Konstrukte -449/-249 und -75/+33 durch die Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3 und -4 sowie Sp1 aktiviert werden, wobei GATA-4 bei beiden Fragmenten die stärkste Aktivierung bewirkt. Das Konstrukt -449/+33, das beide Abschnitte

umfasst, lässt sich ebenfalls von GATA-4 am stärksten aktivieren, wobei kein additiver Effekt der Stimulationen der Konstrukte -449/-249 und -75/+33 erreicht wurde.

4.6 Effekte von GATA-2, GATA-3, GATA-4 und Sp1 auf die EpoR-Expression in humanen Zelllinien

Die funktionelle Relevanz der Bindung der Transkriptionsfaktoren an regulierende Elemente des Zielgens wurde ebenfalls durch die Überexpression dieser Faktoren untersucht. Dazu wurden Expressionsvektoren für die Transkriptionsfaktoren transient oder stabil in Zellen eingebracht. Der Einfluss der Überexpression der Transkriptionsfaktoren auf die Expression des Zielgens wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bzw. quantitativ mittels Real-time PCR und auf Protein-Ebene mittels Western Blot untersucht.

4.6.1 Transiente Transfektion von unterschiedlichen Zelllinien mit GATA-2, -3 oder -4

Nach transienter Transfektion (48 h) mit GATA-2, -3 oder -4, die aus Gründen der Transfektionseffizienz zunächst in HepG2 und HEK293 Zellen durchgeführt wurde, wurde der Einfluss dieser Faktoren auf die *EpoR* mRNA-Expression untersucht.

Die mRNA der Transkriptionsfaktoren konnte in beiden Zelllinien sehr effizient überexprimiert werden. Allerdings konnte keine signifikante Veränderung der *EpoR*-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 19). Die überexprimierten Faktoren beeinflussten sich auch nicht gegenseitig in ihrer Expression. Die mRNA wurden auch mittels Real-time PCR quantifiziert, was das Ergebnis der RT-PCR bestätigte (Daten nicht gezeigt).

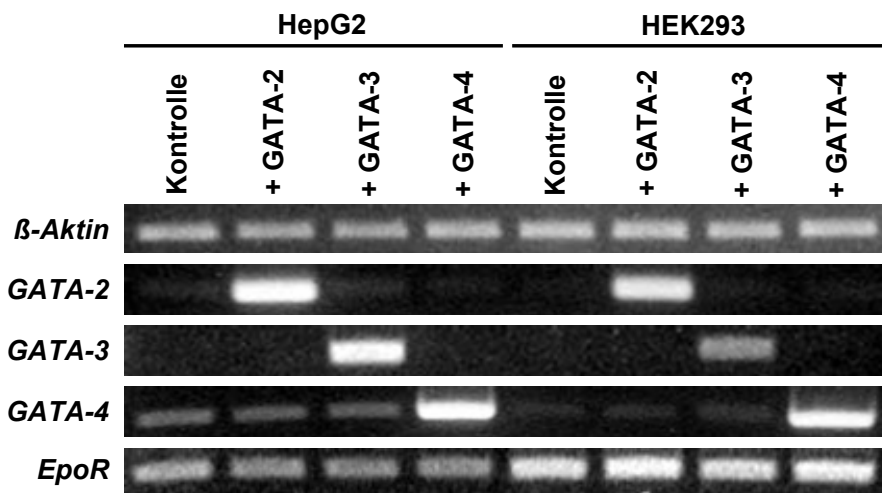


Abbildung 19. Transiente Transfektion von HepG2 und HEK293 Zellen mit GATA-2, -3 und -4. Die Effizienz der Überexpression der Faktoren sowie ihr Einfluss auf die *EpoR*-Expression wurden mittels RT-PCR untersucht. $T_A = 60^\circ\text{C}$, Zyklen: *β-Aktin* = 17x, *GATA*-2, -3, -4 = 22x, *EpoR* = 26x.

Der Einfluss der transienten Transfektion von GATA-2, -3 oder -4 auf die *EpoR*-Expression wurde ferner in unterschiedlichen Zelllinien, einschließlich der Zellen mit neuronalem Phänotyp, auch auf Proteinebene überprüft (Tabelle 32). Sowohl in den neuronalen Vorläuferzellen als auch in anderen Zelllinien konnte eine Änderung der *EpoR*-Expression nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 32. Transiente Überexpression von GATA-2, -3 und -4 in humanen Zellkulturen (Nachweis des *EpoR*-Proteins mittels Western Blot mit dem C-20 Antikörper von Santa Cruz). Zuordnung der Zelllinien zu den unterschiedlichen Gewebetypen, aus denen sie generiert wurden: SH-SY5Y: Neuroblastom; U-2 OS: Osteosarkom; HepG2: Hepatoblastom; HeLa: Zervix-Karzinom; U-87 MG: Glioblastom.

Transkriptionsfaktor	Zelllinie	Dauer der Transfektion
GATA-2	SH-SY5Y, U-2 OS	48 h
GATA-3	SH-SY5Y, U-2 OS, HepG2, HeLa	48 h
GATA-4	SH-SY5Y U-2 OS, U-87 MG	30/60/90 min, 3/6/18/24/48 h 48 h

Transiente Transfektionen verschiedener Zelllinien mit Expressionsvektoren für die GATA-Transkriptionsfaktoren hatten keinen Einfluss auf die EpoR mRNA- oder Proteinexpression.

4.6.2 Stabile Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit GATA-2, -3 oder -4

Nachdem sich in transienten Transfektionen mit GATA-2, -3 oder -4 die *EpoR*-Expression nicht änderte, wurden SH-SY5Y Zellen stabil mit GATA-2, -3 bzw. -4 transfiziert. In diesen Zellen wurde ferner der Einfluss von Hypoxie (2% O₂ für 72 h) und einer Behandlung mit rEpo (5 U/ml) auf die *EpoR*-Expression untersucht. Einerseits interessierte die Frage, ob die Aktivierung des EpoR-Signalweges durch rEpo die *EpoR*-Expression in einem Feedback-Mechanismus beeinflusst. Andererseits sollte in den SH-SY5Y Zellen der Effekt einer Hypoxie analysiert werden, weil darunter in anderen neuronalen Zellen eine Stimulation der *EpoR*-Expression beschrieben ist [16].

Die stabile Transfektion der SH-SY5Y Zellen wurde zunächst mittels Real-time PCR überprüft (Abbildungen 20 und 21). Die *GATA*-2, -3 und -4 mRNA konnte in den SH-SY5Y Zellen erfolgreich stabil überexprimiert werden (Zunahme der mRNA um das 2,4-, 2,7- bzw. 5,6-fache). Die Expression der Faktoren in den Kontrollen wurde durch Hypoxie ebenfalls stimuliert (Zunahme der mRNA um das 2,9-, 3- bzw. 3,4-fache). Der Anstieg der mRNA in den stabil transfizierten Zellen unter Hypoxie war für GATA-2 und GATA-4 höher als jeweils in den transfizierten Zellen unter Normoxie bzw. in den Kontrollzellen unter Hypoxie. Die mit GATA-3 stabil transfizierten Zellen zeigten unter Hypoxie allerdings keine zusätzliche Steigerung der *GATA*-3 mRNA-Expression.

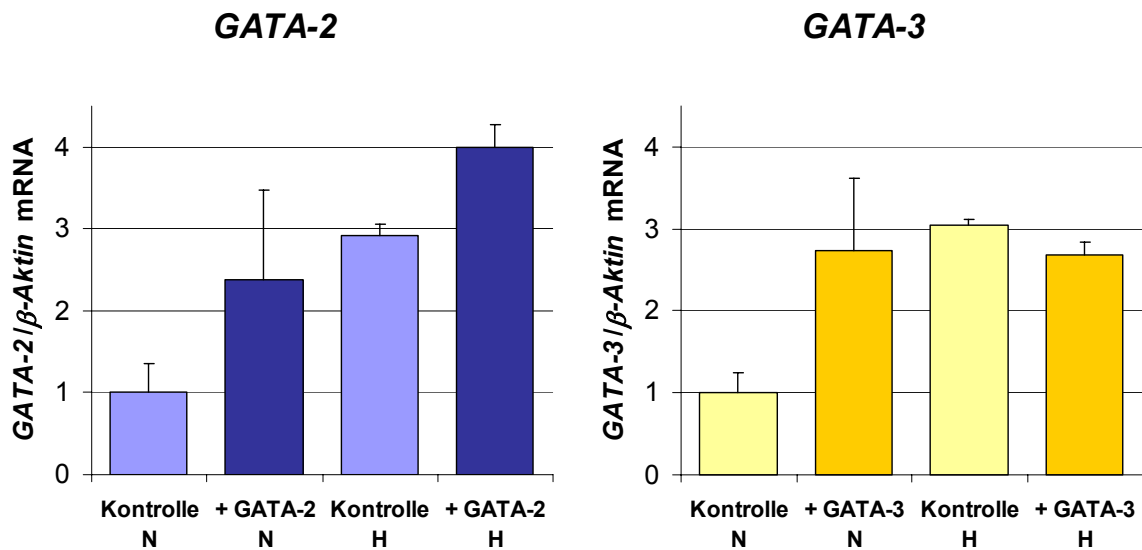


Abbildung 21. Stabile Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit GATA-2 oder -3 unter Normoxie (N) und Hypoxie (H: 2% O₂ für 72 h). Die erfolgreiche Überexpression von GATA-2 bzw. -3 wurde mittels Real-time PCR nach der Standardreihen-Methode nachgewiesen. Die Daten wurden gegen β -Aktin mRNA normalisiert. Unter Normoxie wurden drei unabhängige Experimente, unter Hypoxie nur ein Experiment durchgeführt. Pro Experiment wurden zwei bzw. drei Messungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert der unabhängigen Experimente \pm Standardabweichung aus den einzelnen Messwerten dargestellt. Die mRNA-Expression in den Kontrollzellen unter Normoxie wurde mit 1 definiert.

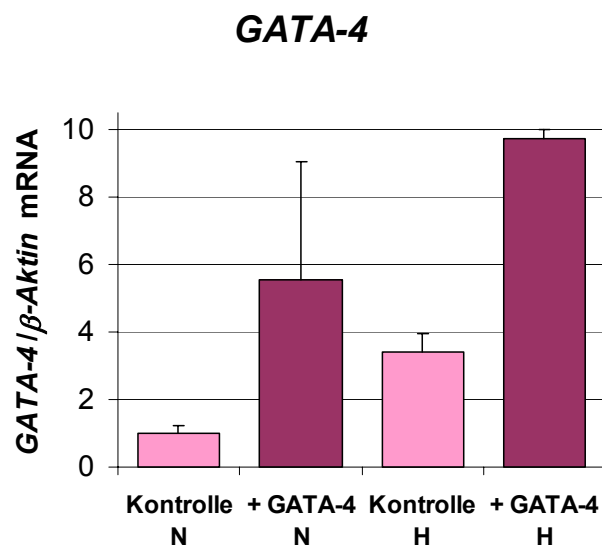


Abbildung 20. Stabile Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit GATA-4 unter Normoxie (N) und Hypoxie (H: 2% O₂ für 72 h). Die erfolgreiche Überexpression von GATA-4 wurde mittels Real-time PCR nach der Standardreihen-Methode nachgewiesen. Die Daten wurden gegen β -Aktin mRNA normalisiert. Unter Normoxie wurden zwei unabhängige Experimente, unter Hypoxie nur ein Experiment durchgeführt. Pro Experiment wurden zwei Messungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert der unabhängigen Experimente \pm Standardabweichung aus den einzelnen Messwerten dargestellt. Die mRNA-Expression in den Kontrollzellen unter Normoxie wurde mit 1 definiert.

Abbildung 22 zeigt den Einfluss der stabilen Transfektionen auf die *EpoR*-Expression unter Normoxie. Die Überexpression von GATA-2 und -3 schien allenfalls zu einer geringen, jedoch nicht signifikanten Reduktion der *EpoR* mRNA-Expression zu führen, während die Überexpression von GATA-4 in einer geringen, aber nicht signifikanten Stimulation resultierte.

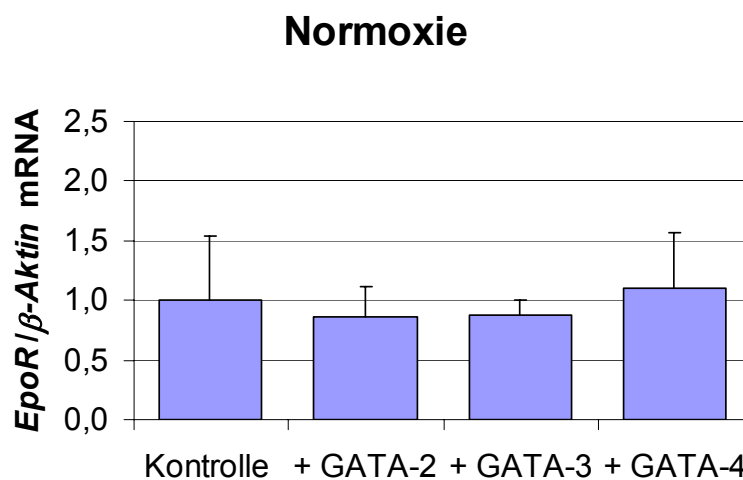


Abbildung 22. *EpoR*-Expression nach stabiler Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit GATA-2, -3 oder -4 unter Normoxie. Die *EpoR*-mRNA wurde mittels Real-time PCR nach der Standardreihen-Methode quantifiziert. Die Daten wurden gegen β-*Aktin* mRNA normalisiert. Die *EpoR*-Expression in den nicht-transfizierten Kontrollzellen wurde mit 1 definiert. Es wurden fünf (Kontrollen) bzw. drei unabhängige Experimente durchgeführt. Pro Experiment wurden zwei bis fünf Messungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert der unabhängigen Experimente ± Standardabweichung dargestellt.

Ferner wurde der Einfluss von Hypoxie und einer rEpo-Behandlung (5 U/ml) auf die *EpoR*-Expression untersucht.

Unter Hypoxie kam es zu einer 1,8-fachen Steigerung der *EpoR* mRNA-Expression ($p < 0,01$) und der inhibierende Einfluss von GATA-2 und -3 wurde deutlicher. Auch GATA-4 führte unter Hypoxie zu einer Reduktion der *EpoR* mRNA-Expression. Allerdings kann zu diesem

Zeitpunkt keine Aussage über die Signifikanz dieser Effekte getroffen werden, da die *EpoR* mRNA-Expression in den GATA-überexprimierenden Zellen unter Hypoxie nur einmal untersucht wurde.

Durch Zugabe von rEpo war unter Normoxie kein deutlicher Einfluss der GATA-Transkriptionsfaktoren auf die *EpoR* mRNA-Expression feststellbar. Die oben beschriebenen Effekte der GATA-Faktoren unter Hypoxie wurden von der rEpo-Behandlung nicht beeinflusst (Abbildung 23).

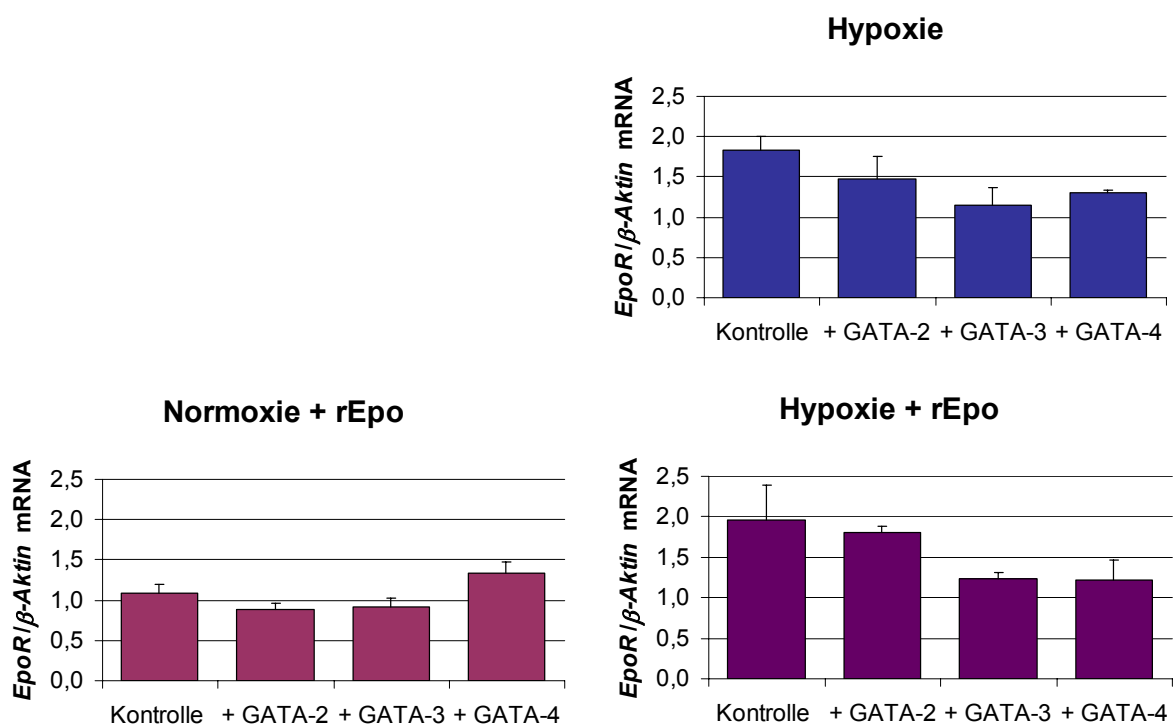


Abbildung 23. Einfluss der stabilen Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit GATA-2, -3 oder -4 auf die *EpoR*-Genexpression. Die Zellen wurden entweder unter Normoxie + rEpo (5 U/ml) oder unter Hypoxie (2% O₂ für 72 h) sowohl mit als auch ohne rEpo inkubiert. Die *EpoR*-mRNA wurde mittels Real-time PCR nach der Standardreihen-Methode quantifiziert. Die Daten wurden gegen *β-Aktin* mRNA normalisiert. Die *EpoR*-Expression in den nicht-transfizierten Kontrollzellen unter Normoxie ohne rEpo-Zugabe (Abbildung 22) wurde mit 1 definiert. Für die Kontrolle unter Hypoxie wurden drei, für die Kontrollen Normoxie/Hypoxie + rEpo wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Für alle anderen Bedingungen ist n = 1. Pro Experiment wurden zwei bis fünf Messungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert der unabhängigen Experimente ± Standardabweichung dargestellt. Bei n = 1 wurde die Standardabweichung aus der Mehrfachmessung der Proben bestimmt.

In den Zellen, die die GATA-Transkriptionsfaktoren stabil überexprimieren, wurde auch die EpoR-Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Dargestellt ist zum einen die Überexpression der GATA-Transkriptionsfaktoren und zum anderen ihr Einfluss auf die EpoR-Proteinexpression, untersucht mit dem EpoR C-20 Antikörper (erwartete Produktgröße 66 kDa) (Abbildung 24). Die GATA-2 und -3 Überexpressionen wurden sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie analysiert, während für die GATA-4 Überexpression nur Proben, die unter Normoxie kultiviert wurden, zur Verfügung standen.

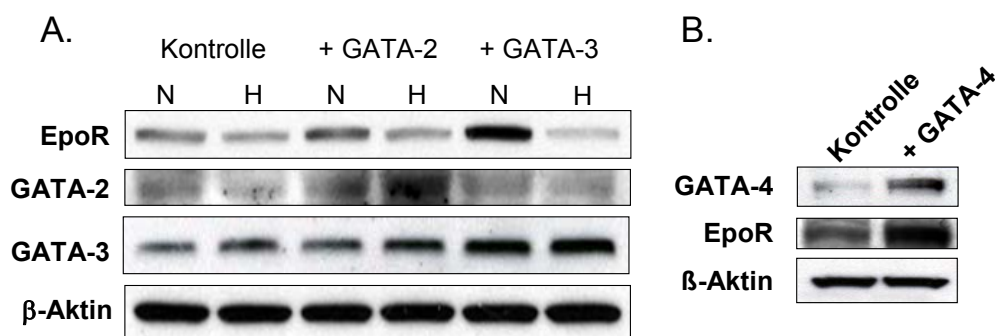


Abbildung 24. Western Blot Analyse von Proteinen aus SH-SY5Y Zellen nach stabiler Transfektion mit GATA-2, -3 und -4. Untransfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Für den Nachweis des EpoR-Proteins wurde der EpoR (C-20) Antikörper (rabbit polyclonal IgG) verwendet. (A) Mit GATA-2 oder -3 stabil transfizierte Zellen wurden unter Normoxie (N) bzw. Hypoxie (H; 1% O₂ für 16 h) kultiviert. (B) Für die GATA-4 Überexpression standen nur Proben, die unter Normoxie kultiviert wurden, zur Verfügung.

Im Gegensatz zu den mRNA-Ergebnissen zeigte der Western Blot in den Zellen, die die jeweiligen GATA-Faktoren stabil überexprimierten, unter Normoxie eine Zunahme des EpoR-Proteins. Ein weiterer Widerspruch war, dass in den untransfizierten Zellen weder eine Stimulation der EpoR- noch der GATA-2 Expression unter Hypoxie nachweisbar war (Abbildung 24). Allerdings wurden die Zellen in diesem Experiment für 16 h unter Hypoxie inkubiert, während die Zellen, die mittels Real-time PCR untersucht wurden, für 72 h unter Hypoxie kultiviert wurden (wie in [16] beschrieben). Die GATA-3 Expression stieg unter Hypoxie in den untransfizierten Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene an.

Da die Ergebnisse der Real-time PCR und der Western Blot Analyse für EpoR mit dem EpoR C-20 Antikörper widersprüchlich sind, wurde die Western Blot Analyse auch mit dem EpoR M-20 Antikörper (Santa-Cruz, erwartete Produktgröße nach [122] 59 kDa) durchgeführt. Wie Abbildung 25 zeigt, führte hier die stabile Überexpression der GATA-Faktoren tatsächlich zu einer geringen Reduktion der EpoR Protein-Expression.

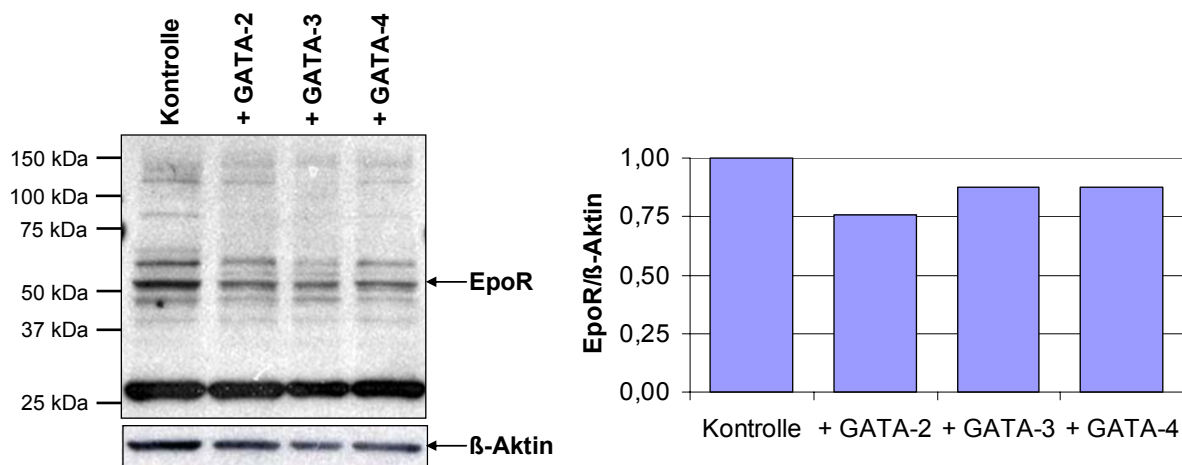


Abbildung 25. Western Blot Analyse von Proteinen aus SH-SY5Y Zellen nach stabilen Transfektionen mit GATA-2, -3 oder -4. Für den Nachweis des EpoR-Proteins wurde der EpoR (M-20) Antikörper (rabbit polyclonal IgG) verwendet. Die angegebene Bande wurde mit Quantity One (Bio-Rad) quantifiziert und gegen β-Aktin Expression normiert.

GATA-2, -3 und -4 konnten in SH-SY5Y Zellen erfolgreich stabil überexprimiert werden. Unter Normoxie hatte die Überexpression keinen Einfluss auf die *EpoR*-Expression. Es konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass Hypoxie die Expression der GATA-Faktoren stimuliert. Während Hypoxie die *EpoR*-Expression stimuliert, schien in den stabil transfizierten Zellen unter Hypoxie die *EpoR*-Expression reduziert zu sein. Eine rEpo-Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Expressionsniveau des *EpoR*.

4.6.3 Co-Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit Sp1 und GATA-2, -3 oder -4

Die Wirkung der GATA-Transkriptionsfaktoren auf die *EpoR*-Expression könnte jedoch auch von der Verfügbarkeit von Co-Faktoren abhängen. Um eine eventuelle Kooperation zwischen Sp1 und den GATA-Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden SH-SY5Y Zellen mit einem Expressionsvektor für Sp1 und mit einem weiteren Expressionsvektor für die GATA-Transkriptionsfaktoren co-transfiziert (48 h).

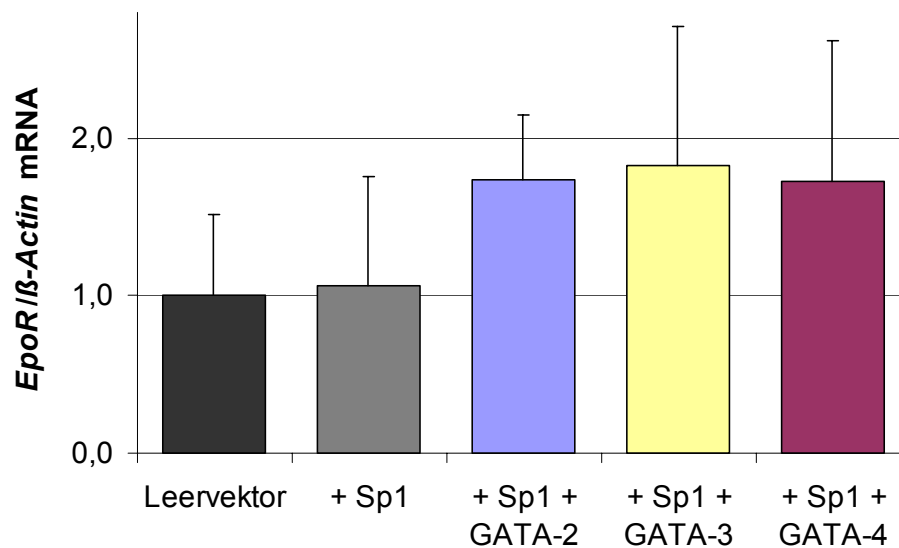


Abbildung 26. Einfluss transientser Co-Transfektion von SH-SY5Y Zellen mit Sp1 und GATA-2, -3 oder -4 auf die *EpoR*-Genexpression. *EpoR*-mRNA wurde mittels Real-time PCR nach der Standardreihen-Methode quantifiziert. Die Daten wurden gegen *β-Aktin* mRNA normalisiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Pro Experiment wurden zwei Messungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert der unabhängigen Experimente \pm Standardabweichung dargestellt. Die mRNA-Expression in den Kontrollzellen wurde mit 1 definiert.

Die Überexpression von Sp1 alleine zeigte keinen Effekt auf die *EpoR* mRNA-Expression, während die gemeinsame Überexpression von Sp1 mit GATA-2, -3 oder -4 in einer

Steigerung der *EpoR*-Expression resultierte (Abbildung 26). Diese Veränderungen waren allerdings statistisch nicht signifikant.

4.6.4 RNA-Interferenz

Eine weitere Methode für die funktionelle Analytik der Wirkung eines Transkriptionsfaktors auf ein Zielgen ist die RNA-Interferenz. Dabei wird entweder eine „nackte“ *small interfering* RNA (siRNA), die zu dem Gen des Transkriptionsfaktors komplementär ist, in die Zellen eingebracht, oder ein Vektor, der für eine siRNA kodiert. Die Bindung der siRNA an die mRNA des Faktors führt zu deren Abbau und somit zu einer Suppression des Gens.

Die RNA-Interferenz für *GATA-2* und *GATA-3* wurde mit *Silencer*® Pre-designed siRNA von Ambion in SH-SY5Y Zellen durchgeführt, wobei die *Silencer*® Negative Control #1 siRNA neben den untransfizierten Zellen als Kontrolle diente (Abbildung 27). Die *GATA-2* mRNA-Expression wurde durch die siRNA um 40%, die *GATA-3* Expression um 57% im Vergleich zu untransfizierten Zellen reduziert. Allerdings führte auch die Transfektion mit der Control siRNA zu einer – wenn auch schwächeren – Reduktion der Expression der Faktoren (23% bzw. 33%). Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. In den SH-SY5Y Zellen, die mit der spezifischen siRNA transfiziert wurden, hatte die erniedrigte *GATA-2* Expression keinen Einfluss auf die *EpoR*-Expression, während die erniedrigte *GATA-3* Expression in einer schwachen – aber statistisch nicht signifikanten – Reduktion der *EpoR*-Expression resultierte. Die Transfektion mit der Control siRNA hatte keinen Einfluss auf die *EpoR*-Expression (Abbildung 27).

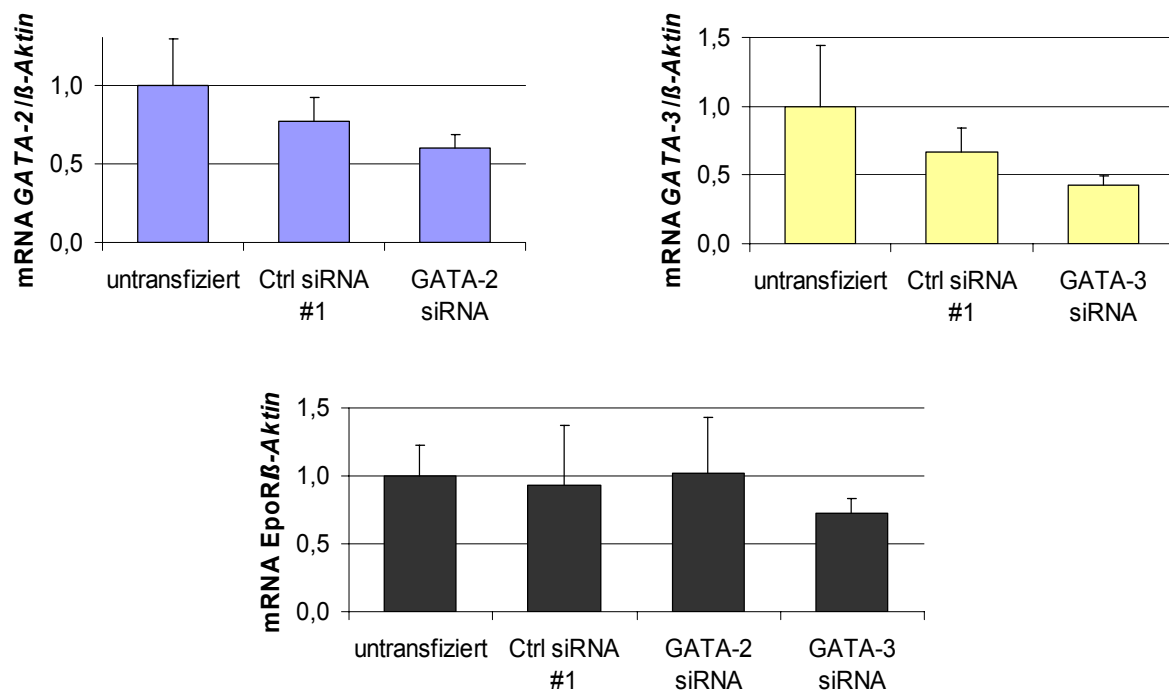


Abbildung 27. Analyse der *GATA-2*, *GATA-3* und *EpoR* mRNA-Expression in SH-SY5Y Zellen, die mit *Silencer*® Pre-designed siRNA (Ambion) transient transfiziert wurden. Die mRNA wurde mittels Real-time PCR nach der Standardreihen-Methode quantifiziert. Die Daten wurden gegen β -Aktin mRNA normalisiert. Die mRNA-Expression in den nicht-transfizierten Zellen wurde mit 1 definiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Pro Experiment wurden drei Messungen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert der unabhängigen Experimente \pm Standardabweichung dargestellt. Ctrl siRNA #1 = *Silencer*® Negative Control #1 siRNA.

Die RNA-Interferenz für *GATA-4* wurde mit einem gegen *GATA-4* gerichteten siRNA-Vektor (pSilencer/hGATA-4.⁸⁵²⁻⁸⁷⁰ [98]) durchgeführt. Die Transfektion der SH-SY5Y Zellen mit diesem Vektor führte nicht zur Reduktion der endogenen *GATA-4* Expression (Daten nicht gezeigt). Um eine unzureichende Transfektionseffizienz der SH-SY5Y Zellen als mögliche Ursache dafür auszuschließen, wurden außerdem die Neuroblastom-Zellen SK-N-AS mit dem pSilencer/hGATA-4.⁸⁵²⁻⁸⁷⁰ transfiziert. Wie in Abbildung 28 gezeigt, konnte bei einer deutlichen Reduktion der *GATA-4* Expression in SK-N-AS Zellen keine Veränderung der *EpoR*-Expression nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mit einer Real-time PCR bestätigt (Abbildung 28 B).

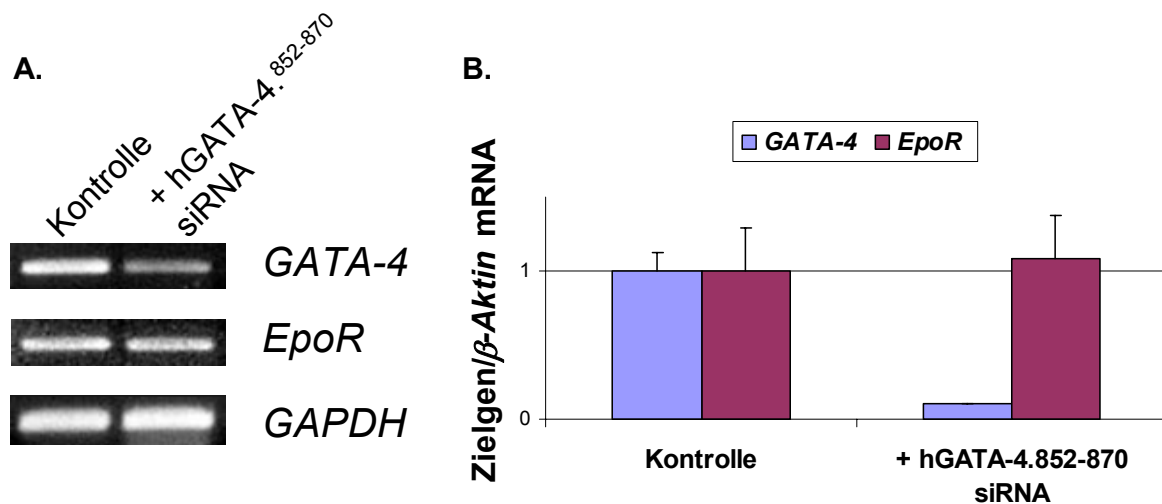


Abbildung 28. Analyse der *EpoR* mRNA-Expression in SK-N-AS Zellen, die mit pSilencer/hGATA-4.⁸⁵²⁻⁸⁷⁰ transient transfiziert wurden. (A) RT-PCR. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Zyklen: *GATA-4* = 24x, *EpoR* = 26x, *GAPDH* = 22x. (B) Quantifizierung mittels Real-time PCR nach der Ct-Methode. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus einer Doppelbestimmung der Proben dargestellt. Die mRNA-Expression in den Kontrollzellen wurde mit 1 definiert.

Mit den siRNA-Experimenten wurde bestätigt, dass die GATA-Faktoren unter Normoxie keinen signifikanten Effekt auf die *EpoR*-Expression ausüben.

4.7 In vivo-Nachweis der Bindung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren an regulierende Sequenzen des *EpoR*-Gens

Eine TRANSFAC Professional Sequenzanalyse der mit Reporter-gen-Assays untersuchten Region des *EpoR*-Gens (-449 bis +33 relativ zur Transkriptionsstartstelle) zeigte jeweils in der Nähe der GATA-Bindungsstellen Cluster von sich teilweise überlappenden Bindungssequenzen für andere Transkriptionsfaktoren. Wie schon erwähnt, gehören dazu Sp1, HNF-3 α /3 β und Ets-2, aber auch Smad3, STAT1, STAT5A/5B, STAT-6, AP-2, YY1 und TBP (*TATA-binding protein*). Die Expression von STAT-1 und AP-2 in SH-SY5Y Zellen

wurde bereits beschrieben [123, 124], die Expression der anderen Faktoren wurde auf mRNA-Ebene in SH-SY5Y Zellen untersucht (Abbildung 29). Es wurden *Sp1*, *HNF-3 α* , *Smad3*, *c-Ets-2*, *STAT6*, *STAT5B*, *YY2* und *TBP* in SY-SY5Y exprimiert, nicht aber *HNF-3 β* und *STAT5A*.

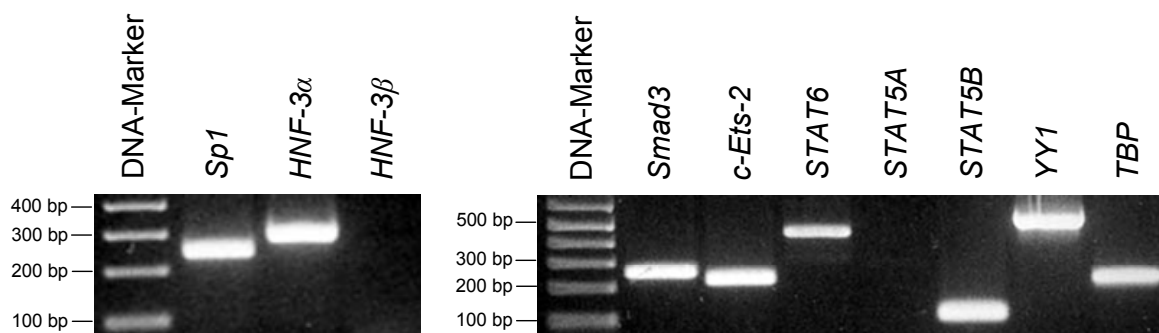


Abbildung 29. mRNA-Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren in SH-SY5Y Zellen, nachgewiesen mittels RT-PCR, 33 Zyklen, $T_A = 58^\circ\text{C}$.

Die Bindung der exprimierten Transkriptionsfaktoren an die 5'-flankierende Region des *EpoR*-Gens wurde *in vivo* in SH-SY5Y Zellen mittels ChIP-Assay untersucht (Abbildung 31). Die DNA-Fragmente waren über 300 bp groß (Abbildung 30).

Als Kontrolle wurde ein Abschnitt der 5'-flankierenden Region des *GAPDH*-Gens amplifiziert, an die nur TBP, acetyliertes Histon und RNA-Polymerase gebunden haben. Für den *EpoR*-Genlocus konnte eine spezifische Bindung von *Sp1*, *Ap-2 α* , *c-Ets-1* oder *c-Ets-2*, TBP, *YY1* und *STAT1* gezeigt werden. Im Gegensatz zum EMSA zeigten die GATA-Faktoren unter *in vivo*-Bedingungen überraschenderweise keine überzeugende Bindung. Die schwache *EpoR*-Bande bei GATA-2 wurde als Hintergrund interpretiert, weil sie auch für *GAPDH* amplifiziert wurde. Die 5'-flankierende Region von *GAPDH* enthält eine einzige GATA-Bindungsstelle, die sich aber knapp 1000 bp entfernt von der im ChIP-Assay amplifizierten Region befindet.

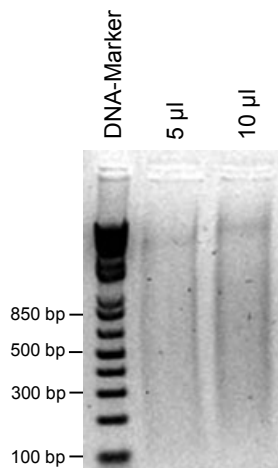


Abbildung 30. Fragmentgrößen der gescherten DNA beim Chromatin-Immunpräzipitations-Assay. Es wurde ein Testvolumen von 5 bzw. 10 µl auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Das Bild wurde zur besseren Darstellung invertiert.

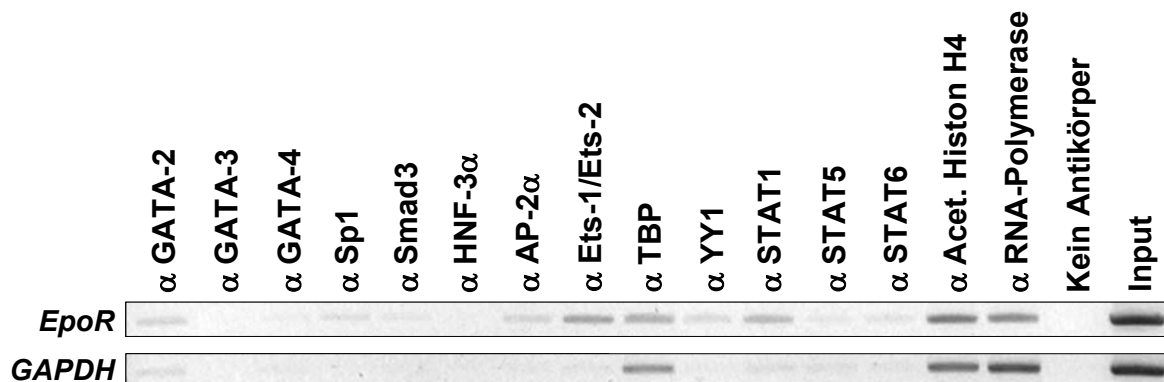


Abbildung 31. Chromatin-Immunpräzipitations-Assay in SH-SY5Y Zellen. Aus den DNA-Fragmenten, die nach Präzipitation mit spezifischen Antikörpern aufgereinigt worden sind, wurden genregulierende Sequenzen mittels PCR amplifiziert. $T_A = 60^\circ\text{C}$, 34 Zyklen. Invertierte Darstellung des Gels.

Die Transkriptionsfaktoren, die im ChIP-Assay eine Bindung an die 5'-flankierende Region des *EpoR* gezeigt haben, spielen möglicherweise eine Rolle bei der Regulation dieses Gens in neuronalen Zellen und könnten für die Aktivitäten der unterschiedlichen Abschnitte in den Reporter-gen-Assays verantwortlich sein.

5 DISKUSSION

5.1 Relevanz des Epo/EpoR-Systems im ZNS

Zahlreiche Untersuchungen belegen die neuroprotektiven Effekte von rEpo, das unter Ischämie und nachfolgender Reperfusion die Apoptose von neuronalen Zellen reduziert [7, 125, 126]. Die gewebeprotectiven Effekte des rEpos werden aber anscheinend nicht allein durch das klassische EpoR-Homodimer vermittelt, sondern auch über Heterodimere, was in der β cR Knock-out-Maus gezeigt werden konnte [32].

Zur Bedeutung des Epo/EpoR-Systems für die normale neuronale Entwicklung gibt es gegensätzliche Befunde aus unterschiedlichen Untersuchungsmodellen. Wu *et al.* zeigten zunächst, dass sich die Proliferation von Zellen aus dem Gehirn (temporaler Cortex, dorsaler Thalamus und Area praeoptica) von $EpoR^{+/+}$ und $EpoR^{-/-}$ Mausembryonen kaum unterscheidet [50]. Yu *et al.* dagegen wiesen in einer $EpoR^{-/-}$ Maus nach, dass der EpoR für die normale Gehirnentwicklung notwendig ist. Die $EpoR^{-/-}$ Mäuse zeigten am Tag E11,5 der Entwicklung eine Hypoplasie des Neuroepithels im Bereich des IV. Ventrikels, die sich am Tag E12,5 noch ausgeprägter darstellte. Außerdem zeigten diese Mausmutanten ab dem Entwicklungstag E10,5 eine erhöhte Apoposerate im cerebralen Cortex und Neuroepithel des Mittelhirns. In primären Kulturen aus cortikalen Zellen der $EpoR^{-/-}$, $EpoR^{+/-}$ und $EpoR^{+/+}$ Mausembryonen (E10,5) wies die Arbeitsgruppe ferner eine Abnahme der neuronalen Progenitorzellen bei EpoR-Defizienz nach [16]. Suzuki *et al.* generierten eine $EpoR^{-/-}$ Maus, bei der die letalen Defekte der Hämatopoiese durch eine transgene GATA-1 Minikassette mit hämatopoietischen Regulatorodomänen überwunden werden konnten. Diese Mausmutante, die den EpoR ausschließlich in hämatopoietischen Zellen exprimierte, entwickelte sich trotz der fehlenden $EpoR$ -Expression in den anderen Organen normal. Daraus schlossen die Autoren, dass die nicht-hämatopoietische $EpoR$ -Expression für die Entwicklung entbehrlich ist [15]. Tsai *et al.* entwickelten eine konditionelle $EpoR$ Knock-down-Maus, bei der eine Deletion des $EpoR$ in radialen Gliazellen des sich entwickelnden Cortex, Rauten- und Kleinhirns zu einer signifikant verminderten Zellproliferation in der subventrikulären Zone des adulten Gehirns führte. Außerdem war bei dieser Mausmutante im adulten Gehirn die Neurogenese nach einem

Infarkt verringert. Letzteres war durch eine verminderte Migration von Neuroblasten in das Gewebe um das Infarktareal bedingt. Diese Versuche und die Tatsache, dass die *Epo*^{-/-} und die *EpoR*^{-/-} Mäuse identische Defekte in der embryonalen Neurogenese zeigten, belegen die essentielle Rolle des klassischen EpoR in der embryonalen und adulten Neurogenese sowie bei der Migration von neuronalen Vorläuferzellen im Rahmen der Geweberegeneration nach einer Ischämie [17].

Um einen optimalen neuroprotektiven Effekt von rEpo zu erreichen, ist das Verständnis der Regulation des *EpoR* deshalb von besonderem Interesse. In dieser Arbeit konnten neue Kenntnisse der molekularen Mechanismen der *EpoR*-Regulation hinzugewonnen werden.

5.2 Expression des *EpoR* und potentieller Regulatoren seiner Genexpression *in vivo*

Neben der molekularbiologischen Untersuchung der transkriptionellen Regulation des *EpoR*-Gens im ZNS in einem zellulären System wurde auch die Expression des EpoR und der potentiellen Regulatoren *in vivo* analysiert. Dafür wurde die Proteinexpression im Rückenmark und Gehirn der embryonalen bzw. fetalen Maus im Verlauf der intrauterinen Entwicklung (E11,5, E14,5 und E18,5) mittels Immunhistochemie sowie die mRNA-Expression in humanen fetalen Geweben in der 23. und 35. Woche pc untersucht.

Für den Nachweis des EpoR-Proteins im sich entwickelnden ZNS der Maus wurde der EpoR (M-20) rabbit polyclonal IgG der Firma Santa Cruz verwendet. Nach Abschluss der Untersuchung stellte sich allerdings heraus, dass dieser Antikörper für den immunhistologischen Nachweis des EpoR ungeeignet ist, da er auch Gewebe aus *EpoR*^{-/-} Embryonen anfärbt [122], was in unseren Nachuntersuchungen bestätigt wurde (Abbildung 32).

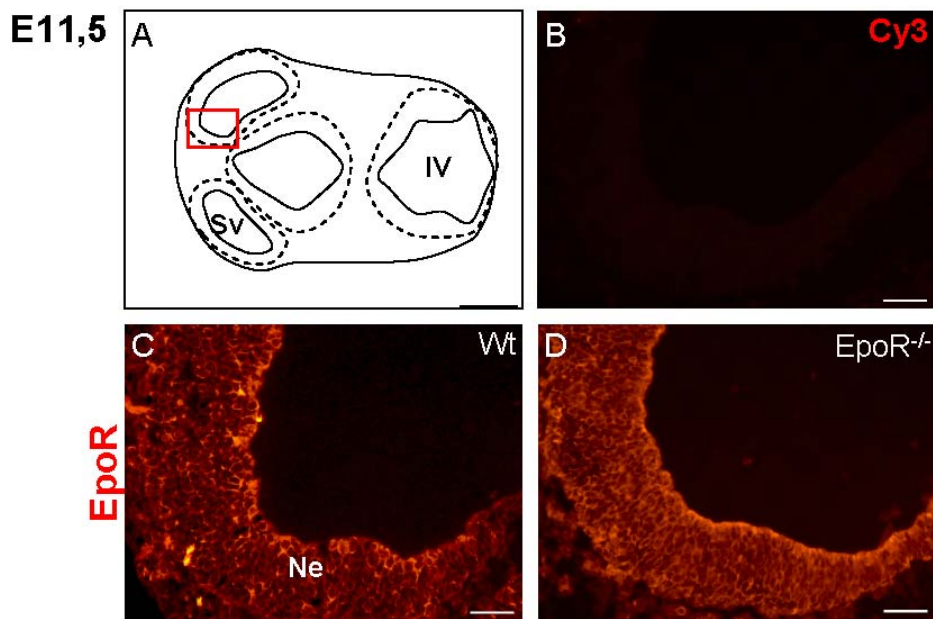


Abbildung 32. Immunhistologische Detektion des EpoR in Gehirnschnitten eines Wildtyp- und *EpoR*^{-/-} Embryos (E11,5) mit EpoR rabbit polyclonal antibody (M-20, Santa Cruz) + CyTM 3-conjugated donkey anti-rabbit IgG. In dem Übersichtsschema ist der Bildausschnitt markiert, der in den nachfolgenden Bildern vergrößert dargestellt wird. Schnittorientierung: rechter Bildabschnitt = dorsal, linker Bildabschnitt = ventral; Ne = Neuroepithel, Sv = Seitenventrikel, IV = Vierter Ventrikel. Maßstabsbalken: (A) 500 µm, (B-D) 50 µm.

Wir haben daraufhin noch einen weiteren in Frage kommenden Antikörper getestet (Anti-mouse Epo R, R&D Systems), der für den spezifischen Nachweis des EpoR-Proteins im Gewebe der Maus ebenfalls nicht geeignet ist (Daten nicht gezeigt).

Eine kürzlich erschienene Korrespondenz zu der Publikation von Elliott *et al.* [122] belegt, dass der M-20 Antikörper von Santa Cruz nicht für Immunhistochemie empfohlen werden kann [127]. Der C-20 Antikörper von Santa Cruz, der den humanen EpoR detektieren soll, scheint für immunhistologische Analysen ebenfalls nicht geeignet zu sein [122]. Beide Antikörper wurden jedoch von vielen Arbeitsgruppen unter anderem zum Nachweis der entwicklungsabhängigen Expression des EpoR und seiner Expression in unterschiedlichen Arealen des murinen und humanen Nervensystems verwendet, so dass wir den M-20 Antikörper zunächst für unsere Untersuchungen des murinen ZNS verwendet hatten. Nach den neuesten Erkenntnissen sind aber sämtliche Publikationen mit immunhistologischem Nach-

weis des EpoR [9, 39, 54, 55, 128, 129], kritisch zu betrachten. Zuverlässige Daten zur EpoR-Expression im Gehirn scheinen im Moment nur die Untersuchungen auf mRNA-Ebene zu liefern. Liu *et al.* beschrieben zunächst eine hohe *EpoR* mRNA-Expression im embryonalen Mausgehirn (E10) mit abnehmender Expression im Laufe der Entwicklung bis hin zu nicht detektierbaren Levels nach der Geburt [130]; sie konnten allerdings später durch Erhöhung der Sensitivität der Analyse auch im adulten Gehirn *EpoR*-mRNA nachweisen [53]. Andere Arbeitsgruppen zeigten im Gehirn der adulten Maus ebenfalls *EpoR*-mRNA [51, 52]. Digicaylioglu *et al.* haben in adulten Mäusen mit radioaktiv-markiertem Epo Epo-Bindungsstellen in verschiedenen Bereichen des Gehirns, vor allem in der weißen Substanz, gefunden. Besonders stark angefärbt waren z.B. die Capsula interna, das Corpus callosum, die Fimbria hippocampi und die Zona incerta; eine autoradiographische Färbung wurde aber auch in neocorticalen Regionen und im Hippocampus, hier besonders in den Pyramidenzellen gezeigt [51].

Neben der EpoR-Expression wurde in den eigenen Untersuchungen auch die Expression der GATA-Transkriptionsfaktoren (GATA-2, -3 und -4) im embryonalen ZNS der Maus mittels immunhistologischer Färbungen beschrieben. Die Ergebnisse der Doppelfärbungen zur Analyse der Co-Lokalisation der GATA-Faktoren mit dem EpoR (Abbildungen 8 und 10) können wegen der bereits diskutierten Unspezifität des Antikörper nicht für die Auswertung herangezogen werden.

Die eigenen Daten erweitern aber den Kenntnisstand über die Expression der GATA-Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung. Dies kann eine Basis für spätere Untersuchungen zur Funktion der Transkriptionsfaktoren bei der Spezifikation neuronaler Zellen sein, einerseits während der normalen Entwicklung, andererseits bei Krankheitsprozessen, die mit einer Insuffizienz der GATA-Transkriptionsfaktoren assoziiert sind. Als Beispiel für eine angeborene GATA-3 Insuffizienz ist das HDR-Syndrom zu nennen, das durch die Trias von Nebenschilddrüsenunterfunktion (*hypoparathyroidism*), Taubheit (*deafness*) und renale Dysplasie (*renal dysplasia*) gekennzeichnet ist [131].

Im Rückenmark wurde GATA-2 Protein vor allem in der Mantelzone mit einer entwicklungsabhängigen Abnahme der Expression (E11,5-E18,5) detektiert, während in der Ventrikularzone nur eine schwache Färbung zu sehen war (Abbildung 7, A-F). *In situ*-Untersuchungen

zeigten dagegen nur vorübergehend *GATA-2* mRNA im ventralen Teil der Ventrikular- und Subventrikularzone (E10,5-E11,5), nicht aber in der Mantelzone [85]. Während Nardelli *et al.* vermuteten, dass es sich bei diesen Zellen um Vorläufer von Moto- und Interneuronen handelt [85], haben Zhou *et al.* mit *GATA-2* YAC (*yeast artificial chromosome*) transgenen Mäusen gezeigt, dass die *GATA-2* exprimierenden Zellen post-mitotische V2 Interneurone sind [89]. Im embryonalen Gehirn der Maus wurde ebenfalls ein während der Entwicklung abnehmendes Expressionsmuster gezeigt, hier vor allem im Rautenhirn (E11,5), im Mittel- und Vorderhirn (E14,5; Abbildung 7, G-J) sowie im weiteren Verlauf fast ausschließlich im Mittelhirn (E18,5). Die Abnahme der *GATA-2* Expression im Rautenhirn nach E11,5 wurde auch von Zhou *et al.* beobachtet [89]. Die *GATA-2* Expression im embryonalen ZNS der Maus wurde in der Literatur bisher nur bis zum Entwicklungstag E12,5 untersucht [85, 89]. In der vorliegenden Arbeit wurde die *GATA-2* Expression zum ersten Mal in den Entwicklungsstadien E14,5 und E18,5 vor allem im Rückenmark sowie Mittel- und Vorderhirn beschrieben.

Erste Arbeiten zur Funktion von *GATA-2* in der neuronalen Entwicklung zeigen, dass dieser Transkriptionsfaktor für die Entwicklung von V2 Interneuronen und serotonergen 5-HT Neuronen relevant ist [89, 90]. Wie kürzlich beschrieben wurde, wirkt *GATA-2* nicht unbedingt auf die neuronale Differenzierung, sondern stoppt die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [132]. In den stabil *GATA-2* überexprimierenden Neuroblastomazellen SH-SY5Y fällt allerdings nur eine gering verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu Kontrollzellen auf (Daten nicht gezeigt).

GATA-3 Protein wurde in spezifischen Regionen des ZNS nachgewiesen. Die Expression im ventralen Rückenmark nahm im Verlauf der Entwicklung stark ab (für E11,5 Abbildung 9, A-D), was mit den Beobachtungen von George *et al.* zur *GATA-3* mRNA-Expression übereinstimmt. Diese Arbeitsgruppe konnte *GATA-3* ebenfalls im embryonalen Mes- und Diencephalon bis zum Tag E14,5 nachweisen [92]. In diesen Entwicklungsstadien wurde hier ebenfalls das *GATA-3* Protein detektiert; darüber hinaus konnte eine *GATA-3* Expression im Mittelhirn und im Pons auch in späteren Entwicklungsstadien (E18,5) nachgewiesen werden (Abbildung 9, E-H). *GATA-3* spielt eine entscheidende Rolle für die Entwicklung serotonerger Neurone der Raphe-Kerne im ZNS [94] und ist an der axonalen Navigation von efferenten Neuronen des Innenohrs beteiligt [93].

Eine GATA-4 Expression im ZNS wurde bisher noch nicht beschrieben. GATA-4 Protein wurde zwar in migrierenden Neuronen, die GnRH sezernieren, nachgewiesen, die aber außerhalb des ZNS entstehen und anschließend in den Hypothalamus wandern. Ausdifferenzierte GnRH-sezernierende Neuronen exprimieren kein GATA-4 [86]. In dieser Arbeit konnte GATA-4 vor allem in der Bodenplatte und im Notochord der sich entwickelnden Maus (Rückenmark E11,5 und E14,5; Rautenhirn nur E11,5) nachgewiesen werden (für E11,5: Abbildung 11), allerdings war das Protein nicht in Zellkernen, sondern nur im Cytoplasma detektierbar. Das lässt vermuten, dass der Transkriptionsfaktor nicht mehr aktiv ist.

Während die Ergebnisse aus der Untersuchung der EpoR-Proteinexpression leider nicht herangezogen werden können, können aus der mRNA-Expressionsanalyse in den fetalen humanen Geweben Schlüsse über die Co-Expression von EpoR und den GATA-Faktoren gezogen werden. Die Co-Expression von *EpoR* und *GATA-2* bzw. *GATA-3* im Rückenmark, in den Stammganglien und in der Hypophyse humaner fetaler Gewebeproben kann eine biologische Bedeutung von GATA-2 und -3 bei der *EpoR*-Regulation nahe legen. *GATA-4* wurde in den untersuchten Proben allerdings nicht detektiert. Die humanen fetalen Stadien (23. und 35. Woche pc) entsprechen bei der Maus den Entwicklungstagen E9,5-E10 bzw. E11,5-E12. In diesem Stadium konnten wir das GATA-4 Protein allerdings auch nur im Cytoplasma nachweisen, was auf dessen Inaktivität hinweist.

Da in hämatopoietischen Zellen eine Kooperation von GATA-1 und Sp1 bei der *EpoR*-Regulation beschrieben wurde [62], wurde die Sp1-Expression im ZNS der sich entwickelnden Maus ebenfalls untersucht, auch mit Doppelfärbungen von Sp1 mit GATA-2 bzw. GATA-3. Sp1 wurde bisher als ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor beschrieben [133], wobei ein organspezifisches Expressionsniveau unterschieden werden kann [134]. Diese Arbeitsgruppe wies in der Maus eine starke Expression von Sp1 in neuronalem Gewebe am Tag E8,5 und E12,5 der Entwicklung nach [134]. In der eigenen Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Sp1-Expression auf das Neuroepithel (Ventrikularzone) des ZNS beschränkt (für Rückenmark siehe Abbildung 12). Aus dem Neuroepithel entwickeln sich unterschiedliche Zelltypen (u.a. neuronale und Gliavorläuferzellen), die dann diese Schicht verlassen, so dass das Neuroepithel und damit auch die Ventrikularzone im Laufe der Entwicklung immer schmaler werden. In den übrigen Schichten (z.B. Mantelschicht) waren nur einige wenige

Zellkerne positiv für Sp1. Später in der Entwicklung (E18,5) fand sich in der dorsalen Marginalschicht eine Reihe Sp1-exprimierender Zellen, zu deren morphologischen Charakter noch keine Aussage gemacht werden kann. Anders als bisher beschrieben [133], wird Sp1 in der Entwicklung offensichtlich nicht in allen Zelltypen des sich entwickelnden Nervensystems exprimiert.

Mittels Doppel-Immunhistochemie wurde untersucht, ob Sp1 und die GATA-Transkriptionsfaktoren in den gleichen Zellen exprimiert werden und diese Faktoren somit in einem Komplex an der *EpoR*-Regulation beteiligt sein könnten. Im Entwicklungsstadium E11,5 colokalisiert Sp1 insbesondere mit GATA-2 sowohl im Rückenmark als auch im Gehirn, in einzelnen Zellen aber auch mit GATA-3. In späteren Entwicklungsstadien findet sich nur in wenigen Zellen eine Co-Lokalisation von Sp1 und den GATA-Faktoren (E14,5 und E18,5). Eine Interaktion von Sp1 mit GATA-2 oder GATA-3 *in vivo* ist also vorstellbar.

5.3 Rolle der GATA-Transkriptionsfaktoren bei der *EpoR*-Genregulation

Die Beobachtungen, dass GATA-Transkriptionsfaktoren als gewebespezifische Regulatoren des *Epo* agieren [96, 97, 98] und dass GATA-1 die *EpoR*-Expression in hämatopoietischen Zellen stimuliert [60, 61], führten zu unserer Hypothese, dass GATA-Transkriptionsfaktoren für die Expression des *EpoR* im ZNS bzw. in neuronalen Zellen funktionell relevant sind. In der 5'-flankierenden Region des *EpoR* finden sich mehrere potentielle Bindungsstellen für GATA-Faktoren (Abbildung 3). Außerdem ist eine Stimulation der *EpoR*-Expression nach stabiler Überexpression von GATA-3 in humanen neuronalen Vorläuferzellen NT2 beschrieben [16]. Es ist allerdings nicht bekannt, ob diese Zellen durch die Verwendung eines speziellen Mediums differenziert waren oder – was wahrscheinlicher erscheint – in einem undifferenzierten Status erhalten blieben.

Zur Untersuchung der molekularen Regulationsmechanismen des *EpoR* in neuronalen Zellen wurde zunächst ein zelluläres *in vitro*-Modell etabliert. Dafür wurde die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y gewählt, da diese Zelllinie bereits als ein gutes Modell für die neuronale Zelldifferenzierung [118], für die zelluläre Neuroprotektion durch rEpo [119, 120],

sowie für die Neuronen-spezifische und Hypoxie-induzierbare *Epo*-Genexpression beschrieben wurde [121]. SH-SY5Y Zellen exprimieren neben *Epo* und *EpoR* die Transkriptionsfaktoren GATA-2, -3 und -4 (Abbildung 15).

Diese GATA-Transkriptionsfaktoren binden unter *in vitro*-Bedingungen tatsächlich mit einem spezifischen Muster an die 5'-flankierende Region des humanen *EpoR*-Gens. Wie im EMSA gezeigt, sind die GATA-Bindungsmotive in Position -1487 und +133 funktionell nicht relevant, während GATA-3 an die GATA-Motive in Position -520 und -487, GATA-3 und -4 in Position -44 sowie GATA-2, -3 und -4 in Position -271 binden (für Position -44 und -271 siehe Abbildung 16). Mittels EMSA konnte zwar ein Komplex identifiziert werden, zu dessen Bildung die GATA-Proteine spezifisch beitragen, es muss aber hinterfragt werden, ob dies auch unter *in vivo*-Bedingungen der Fall ist. Im ChIP-Assay wurde in den SH-SY5Y Zellen keine eindeutige Bindung von GATA-2, -3 oder -4 an die *EpoR*-Promotorregion nachgewiesen (Abbildung 31). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren kann allerdings auch über einen Komplex aus mehreren Proteinen stattfinden, die nicht mit jeder Methode gleichermaßen effizient nachweisbar ist. Ferner könnte die Bindung von bestimmten Bedingungen wie Hypoxie/Ischämie oder dem Vorhandensein bestimmter Faktoren (Cofaktoren, Wachstumsfaktoren) abhängig sein. Die bisher durchgeführten Bindungsstudien lassen noch keine Aussagen über das Vorhandensein oder die Art eventueller Komplexbildungen zu. Die nicht nachweisbare *in vivo*-Bindung der GATA-Faktoren an die *EpoR* 5'-flankierende Region kann aber auch in methodischen Schwächen des ChIP-Assays begründet sein. Der Versuch erfordert eine Scherung der DNA mittels Ultraschall, bei der die temperaturempfindlichen GATA-Proteine möglicherweise dermaßen beschädigt werden, dass sie nicht mehr von den entsprechenden Antikörpern erkannt werden. Auch hängt der Erfolg des ChIP-Assays stark von der Qualität der Antikörper ab.

Um die funktionelle Bedeutung der GATA-Transkriptionsfaktoren für die *EpoR*-Regulation zu analysieren, wurden Reporter-gen-Assays durchgeführt. In hämatopoietischen Zellen wurden innerhalb der 5'-flankierenden Region des *EpoR*-Gens eine positiv regulierende Domäne (-76/+78) sowie zwei negativ regulierende Domänen (-1050/-450 und +78/+136) beschrieben (Abbildung 3) [59]. Wegen der *in vitro*-Bindung der GATA-Faktoren in Position -271 und -44 wurde in der vorliegenden Arbeit die Region von -449 bis +33 relativ zur

Transkriptionsstartstelle in den SH-SY5Y Zellen genauer untersucht. Die Aktivitäten der verschiedenen *EpoR*-Promotorabschnitte zeigten die Bindung der RNA-Polymerase in den Regionen -449/-249 und -75/+33 (Abbildung 17). In hämatopoietischen Zellen wurde die Region -75/+33 als minimaler Promotor beschrieben [59]. Es fällt aber auf, dass das Fragment, dem die GATA-Bindungsstelle in Position -271 fehlt (-449/-285), eine gleich hohe Aktivität aufweist wie das gesamte untersuchte Fragment -449/+33. Diese Aktivität ist mehr als doppelt so hoch, wie die Aktivität der beiden einzelnen Fragmente -449/-249 und -75/+33 (Abbildung 17). Die stärkste Aktivierung der Reportergen-Expression geht demnach von der Region -449/-285 aus, während die Aktivierung geringer ist, wenn das Konstrukt um eine Sequenz, die die GATA-Bindungsstelle enthält, bis zur Position -249 verlängert wird. Die verminderte Aktivierung ist anscheinend nicht alleine vom Vorhandensein der GATA-Bindungsstelle abhängig, weil die Mutation dieser Sequenz (GATA mut -271) nur in einer geringen, aber nicht signifikanten Steigerung der Aktivität resultiert. Die Mutation der GATA-Bindungsstelle in dem Konstrukt mit dem minimalen Promotor (GATA mut -44) resultiert auch in einer geringen, aber nicht signifikanten Steigerung der Aktivität verglichen mit dem Wildtyp-Konstrukt (-75/+33). Dies weist ebenfalls auf einen eher inhibierenden Effekt der GATA-Faktoren alleine oder eines Komplexes von Faktoren, die ihre Wirkung über die GATA-Bindungsstelle vermitteln, hin. Überraschenderweise stimulieren aber die überexprimierten GATA-Faktoren die *EpoR* Reportergen-Konstrukte, wobei GATA-4 die stärkste Zunahme der Aktivierung verursacht (Abbildung 18).

Die Diskrepanz zwischen der eher inhibierenden Funktion der GATA-Bindungsstellen bei der basalen Aktivität der *EpoR*-Konstrukte und der Erhöhung dieser Aktivität durch die überexprimierten GATA-Faktoren ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass für die transgenen GATA-Faktoren eventuelle Co-Faktoren nicht ausreichend zur Verfügung standen. Es ist bekannt, dass die GATA-Transkriptionsfaktoren mit den Co-Faktoren FOG-1 und FOG-2 (*friend of GATA*) interagieren. Eine Interaktion z.B. von GATA-4 und FOG-2 kann, je nach Promotor oder Zelltyp, sowohl zu einer synergistischen Aktivierung als auch zu einer Repression von GATA-abhängigen Promotoren führen [135]. In einem kürzlich im Rahmen des Nachfolgeprojektes durchgeführten Experiment wurden GATA-2, -3 und -4 mit FOG-2 in Reportergen-Assays co-exprimiert. Tatsächlich konnte die zuvor beobachtete Stimulation der Reportergen-Expression verhindert (Konstrukt -75/+33) bzw. die Aktivität sogar erniedrigt

werden (Konstrukt -449/-249) (Daten nicht gezeigt).

Da in den Reporter-gen-Assays die Rolle der GATA-Transkriptionsfaktoren nicht eindeutig charakterisiert werden konnte, wurde der Effekt von Überexpression und RNA-Interferenz der GATA-Transkriptionsfaktoren in SH-SY5Y Zellen, aber auch in anderen neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien untersucht. Transiente Transfektionen von verschiedenen Zelllinien mit GATA-2, -3 bzw. -4 zeigten keinen Einfluss auf die *EpoR* mRNA- bzw. *EpoR* Protein-Expression (4.6.1).

Ferner wurden stabile Transfektionen der SH-SY5Y Zellen mit den GATA-Faktoren sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie durchgeführt. Es wurde außerdem der Einfluss von rEpo sowohl in untransfizierten als auch in den GATA-überexprimierenden Zellen untersucht, da rEpo in einigen Zelllinien die *EpoR*-Expression stimuliert [136].

Unter Hypoxie stieg die *EpoR*-mRNA signifikant an, was Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt: In neuronalen NT2 Zellen wurde eine mehr als doppelt so hohe *EpoR* mRNA-Expression nach Kultivierung der Zellen für drei Tage unter 2% Sauerstoff beobachtet [16]. Im Gehirn neonataler Ratten wurde eine 1,5-fache Erhöhung der *EpoR*-Expression unmittelbar nach einer einstündigen Behandlung mit 8% O₂/92% N₂ sowie nach 24 h ein 3,5-facher Anstieg der *EpoR*-Expression beschreiben [137]. Im adulten Maus-Gehirn fand sich allerdings kein Einfluss von Hypoxie auf die *EpoR*-mRNA [51]. Laut TRANSFAC Professional befinden sich in Position -1224 (gacgtg) und -865 (cacgtc) relativ zur Transkriptionsstartstelle zwei potentielle Bindungsstellen für HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*), dessen funktionelle Relevanz für die *EpoR*-Expression allerdings noch nicht geklärt ist. Die hypoxische Stimulation der *EpoR*-Expression könnte ferner auch indirekt durch Aktivierung von anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt werden.

Unter Normoxie führte die stabile Überexpression von GATA-2 und -3 zu einer leichten Reduktion der *EpoR*-Expression, während GATA-4 die *EpoR*-Expression eher leicht erhöhte (Abbildung 22). Allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant. Unter Hypoxie wurde der inhibierende Effekt von GATA-2 und -3 deutlicher, auch wenn wegen der zu geringen Fallzahl keine Angabe zur Signifikanz gemacht werden kann. Hier fiel die *EpoR*-Expression aber auch in den GATA-4 überexprimierenden Zellen niedriger aus (Abbildung 23). Der inhibierende Effekt der GATA-Faktoren auf die *EpoR*-Expression unter Hypoxie

könnte deshalb deutlicher zum Ausdruck kommen, weil die endogene mRNA-Expression der GATA-Transkriptionsfaktoren unter Hypoxie ungefähr um das Dreifache ansteigt. Mit Ausnahme von *GATA-3* ist die mRNA-Expression der Faktoren in den stabil transfizierten Zellen unter Hypoxie auch höher als unter Normoxie (Abbildung 23). In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde berichtet, dass sich die *GATA-4* Transkription im Herzen der Maus nach intermittierender Hypoxie (5x 2 min 10% O₂ + 2 min 21% O₂) verdoppelt ($p < 0,05$). Ein signifikanter Anstieg der *GATA-4* mRNA wurde bereits zwei Stunden nach der Hypoxie-Behandlung beobachtet und hielt auch 24 h nach der Behandlung an [138].

Die Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit rEpo führte weder unter Normoxie noch unter Hypoxie zu einer signifikanten Änderung der *EpoR*-Expression. Das Ausmaß der Stimulation der *EpoR*-Expression durch rEpo scheint von der jeweiligen Zelllinie abhängig zu sein. Beleslin-Cokic *et al.* analysierten drei verschiedene Endothelzelllinien. In TrHBMEC (*human bone marrow microvascular endothelial cells*) wurde eine Stimulation der *EpoR*-Expression durch rEpo sowohl unter Normoxie (ca. 2-fach) als auch unter Hypoxie (5-fach, $p < 0,001$) erreicht. In HUVEC (*primary human endothelial cells of vein*) und in HUAEC (*primary human endothelial cells of artery*) Zellen führte die rEpo-Behandlung unter Normoxie zu keiner bzw. nur zu einer schwachen (ca. 1,6-fachen) Erhöhung der *EpoR*-Expression, während unter Hypoxie in beiden Zelllinien eine verstärkte *EpoR*-Expression beobachtet wurde (9-fach, $p < 0,001$ bzw. ca. 2,5-fach, $p < 0,05$). Hypoxie alleine stimulierte die *EpoR*-Expression nur in TrHBMEC Zellen (ca. 2-fach) [136]. Die Frage, ob rEpo die *EpoR*-Expression in nicht-hämatopoietischen Zellen erhöht, beschäftigt die Forschung zur klinischen Anwendung von rEpo. So wird derzeit die rEpo-Applikation z.B. bei Frühgeborenen und/oder Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht (SGA; *small for gestational age*) zur Reduktion der Bluttransfusionen klinisch eingesetzt. Allerdings wurde beobachtet, dass diese Behandlung das Risiko für die Frühgeborenen-Retinopathie erhöht [139, 140]. Weiterhin wird in klinischen Studien die Wirkung von rEpo bei der Tumorbedingten Anämie untersucht. Es ist bisher aber nicht eindeutig, wie sich diese Behandlung auf das Tumorstadium und das Überleben auswirkt. Während die meisten Untersuchungen keinen negativen Effekt der rEpo-Behandlung nachweisen konnten, legen einige Studien nahe, dass die rEpo-Behandlung von *EpoR*-exprimierenden Tumorzellen deren Proliferation stimulieren kann. Diese Studien weisen allerdings methodische Schwächen auf (zusammen-

gefasst in [141]). In einzelnen Tumorzelllinien scheint eine längere rEpo-Behandlung die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen [142]. Auch zeigten Studien ein erhöhtes Risiko für thromboemolische Komplikationen (zusammengefasst in [143]). Da die Nebenwirkungen auf den nicht-hämatopoietischen Effekten von Epo beruhen könnten, ist die Frage, ob rEpo die Expression des *EpoR* in diesen Geweben stimulieren kann, von großer Bedeutung.

Die Expression der *EpoR*-mRNA in den mit den GATA-Transkriptionsfaktoren stabil transfizierten Zellen wurde mittels Real-time PCR analysiert. Daneben wurde auch die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse der Real-time PCR und der Western Blot Analyse für EpoR mit dem EpoR C-20 Antikörper sind widersprüchlich, wobei die Daten zur EpoR Protein-Expression anzuzweifeln sind. In der bereits erwähnten Arbeit von Elliott *et al.*, die nach Ausführung der eigenen Experimente publiziert wurde, wird beschrieben, dass der EpoR C-20 Antikörper von Santa Cruz nicht das EpoR-Protein detektiert. Außerdem wurde mittels rekombinantem *full-length* FLAG-EpoR nachgewiesen, dass das zu erwartende Molekulargewicht des EpoR nur 59 kDa beträgt [122]. Eine andere Arbeitsgruppe kommentierte diese Publikation und widersprach beiden Aussagen [144]s. Die Diskrepanz unserer Ergebnisse scheint zu bestätigen, dass die 66 kDa-Bande das EpoR-Protein nicht zeigt. Elliott *et al.* empfehlen den EpoR M-20 Antikörper von Santa Cruz für Western Blot Analysen, der nach ihren Untersuchungen bei 59 kDa eine spezifische EpoR-Bande zeigt [122]. Deswegen wurden die Proteinextrakte aus den stabil transfizierten SH-SY5Y Zellen auch mit dem M-20 Antikörper auf EpoR-Expression untersucht. Hier führte die stabile Überexpression der GATA-Faktoren tatsächlich zu einer leichten Reduktion der EpoR Protein-Expression. Es wurden in diesem Blot aber mehrere Proteinbanden durch den Antikörper detektiert. Die Ergebnisse zur EpoR-Expression unter verstärkter GATA-Expression sind letztlich unter Vorbehalt zu bewerten. Ein weiterer Antikörper, der nach den Daten von Elliott *et al.* den EpoR spezifisch detektiert, stammt von der Firma Upstate Biotech (07-311 anti-mouse EpoR), ist aber mit Erscheinen der Publikation vom Markt genommen worden und stand trotz intensiver Bemühungen nicht für diese Arbeit zur Verfügung.

Außer durch Überexpression kann man die funktionelle Bedeutung der Transkriptionsfaktoren für die Regulation eines Zielgens auch in Zellen bzw. Geweben mit einem Knock-out bzw.

Knock-down des Faktors untersuchen. Die Analyse der *EpoR*-Expression im ZNS von transgenen Mäusen mit einem Knock-out von GATA-2, -3 oder -4 ist wegen der frühen Letalität der Embryonen (E7-E11) schwierig [75, 85, 91]. Eine andere Möglichkeit bietet die RNA-Interferenz mit siRNA, die gegen den jeweiligen Transkriptionsfaktor gerichtet ist. Die Ergebnisse der RNA-Interferenz für *GATA-2*, -3 und -4 bestätigen aber die Daten der stabilen Transfektionen von SH-SY5Y Zellen, dass diese GATA-Faktoren in neuronalen Zellen unter Normoxie keinen signifikanten Effekt auf die *EpoR*-Expression ausüben (Abbildungen 27 und 28).

Die bisherigen Untersuchungen können keine eindeutige Funktion der GATA-Transkriptionsfaktoren für die *EpoR*-Expression in neuronalen Zellen belegen. Sie scheinen, eventuell mit FOG-2 als Co-Faktor, eher eine inhibierende Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie, aber nicht rEpo die *EpoR* mRNA-Expression in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y stimuliert. Die Aussagen der Überexpressions- sowie der RNA-Interferenz-Experimente sind dadurch limitiert, dass die Relevanz von eventuellen Co-Faktoren bzw. Komplexen nur begrenzt zum Ausdruck kommt.

5.4 Bedeutung von Co-Faktoren und anderen Transkriptionsfaktoren für die *EpoR*-Genregulation

Die Untersuchung der Aktivitäten verschiedener Fragmente der *EpoR* 5'-flankierenden Region in Reporter-Gen-Assays weisen auf die Bedeutung weiterer Transkriptionsfaktoren für die *EpoR*-Genregulation hin. Der ChIP-Assay zeigt die Bindung einiger Transkriptionsfaktoren an die *EpoR* 5'-flankierende Region. Zu diesen Faktoren gehören Sp1, AP-2 α , Ets-1 oder Ets-2, TBP, YY1 und STAT1 (Abbildung 31). Eine genauere Sequenzanalyse mit TRANSFAC Professional zeigt in der Nähe der GATA-Bindungsstellen Cluster von sich teilweise überlappenden Bindungsstellen für diese Transkriptionsfaktoren (Abbildung 33).

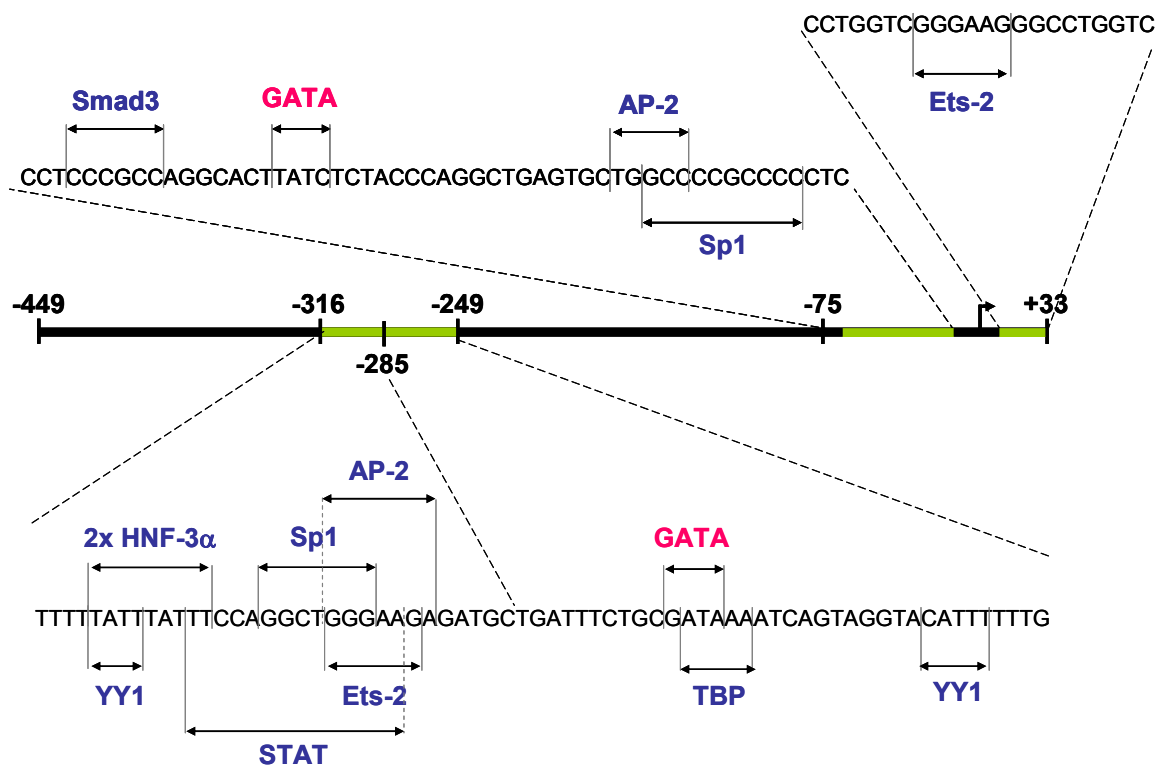


Abbildung 33. Abschnitt der regulierenden Gensequenzen des *EpoR* von Position -449 bis +33 relativ zur Transkriptionsstartstelle. Die nach den Ergebnissen der Reporter-Gen-Assays für die *EpoR*-Expression in neuronalen Zellen funktionell relevanten Bereiche sind grün hervorgehoben, ihre genaue Sequenz ist vergrößert dargestellt. Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die als Kandidaten für die Regulation der *EpoR*-Expression in Frage kommen, sind markiert.

In den durchgeführten Reporter-Gen-Assays wurden neben den Mutationen der GATA-Bindungsstellen auch Konstrukte mit Mutationen in den Sp1-Bindungsstellen (Sp1 mut -294 und Sp1 mut -17) untersucht. Die mutierten Konstrukte sind in beiden Fällen in der Lage, die Aktivität der Wildtyp-Konstrukte vollständig zu unterdrücken (Abbildung 17), was auf eine aktivierende Funktion von Sp1 hinweist. Anschließend wurden die SH-SY5Y Zellen transient mit Sp1 transfiziert. Zusätzlich wurden Co-Transfektionen mit Sp1 und GATA-2, -3 oder -4 durchgeführt. Sp1 alleine zeigte keinen Einfluss auf die *EpoR* mRNA-Expression. Da die Reporter-Gen-Assays eine entscheidende Rolle der Sp1-Bindungsstelle zeigen, ist vorstellbar, dass nicht Sp1, sondern andere Vertreter dieser Familie von Transkriptionsfaktoren für die

Wirkung verantwortlich sind. Es gibt neben Sp1-Sp6 noch viele Sp1-ähnliche Transkriptionsfaktoren, die sämtlich an GC-reiche Promotorregionen binden können (zusammenfassend in [145]).

Die gleichzeitige Überexpression von Sp1 mit GATA-2, -3 bzw. -4 führte zwar jeweils zu einer Stimulation der *EpoR*-Expression (Abbildung 26), die aber wegen der hohen Standardabweichung der Daten statistisch nicht signifikant war. Für die große Streuung der Daten könnten unterschiedliche Expressionslevels der GATA-Faktoren in den Zellen verantwortlich sein. Es ist möglich, dass die Stimulation der *EpoR*-Expression durch Sp1 zusammen mit den GATA-Faktoren, von einem kritischen Level der Expression eines der Faktoren abhängt. Für GATA-2 wurde z.B. beschrieben, dass die Halbwertszeit des endogenen GATA-2 in hämatopoietischen, aber auch in Neuroblastom-Zellen kürzer als 30 Minuten ist und dass das Protein schnell durch das Ubiquitin-Proteasom abgebaut wird [146]. Wenn nun dadurch das Expressionslevel des endogenen GATA-2 in den Zellen variiert, ist vorstellbar, dass trotz stabiler Überexpression nicht immer der stimulierende Effekt auf das Zielgen sichtbar wird.

In erythroiden Zellen wurde eine Kooperation von Sp1 und GATA-1 am minimalen *EpoR*-Promotor nachgewiesen, die zu einer Stimulation der *EpoR*-Expression führt [62]. Unsere Beobachtungen – wenn auch statistisch nicht signifikant – stimmen mit diesen Daten überein. Ein weiteres Beispiel für eine Kooperation zwischen GATA-4 oder -6 mit Sp1 ist die Regulation des humanen *P450c17*-Gens. Dabei binden die GATA-Faktoren zwar an die GATA-Bindungsstellen im Promotor, sind dort aber inaktiv. Binden sie dagegen an Sp1 und dieser Komplex an eine benachbarte Sp1-Bindungsstelle, kommt es zur Genaktivierung [147].

In den Reporter-gen-Assays wurde auch die Mutation der Ets-2 Bindungsstelle im minimalen Promotor untersucht (Ets-2 mut +19). Dieses Konstrukt zeigt eine höhere Aktivität als das Wildtyp-Konstrukt (Abbildung 17), was auf eine Inhibition der Reporter-gen-Expression durch Ets-2 hinweist. Es ist noch zu klären, ob es sich bei dem Faktor tatsächlich um Ets-2 handelt. Die Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren umfasst etwa 30 Mitglieder, die alle an die zentrale GGAA/T Kern-Konsensussequenz binden (zusammengefasst in [148]). Das Motiv GGGAAAG (Position -291 und +19) wurde von TRANSFAC Professional als Ets-2 Bindungsstelle ausgewiesen (Abbildung 33), aber es ist vorstellbar, dass auch andere Mitglieder der Familie dort binden. Kürzlich ist eine Publikation zur Relevanz von Ets-1 für die *EpoR*-

Regulation erschienen. In erythroiden Zellen reduziert die Überexpression von Ets-1 die *EpoR* mRNA-Expression [149], was mit unseren Beobachtungen aus den Reporter-gen-Assay übereinstimmt. Für den ChIP-Assay wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl Ets-1 als auch Ets-2 erkennt und zu einem deutlichen Bindungssignal in der *EpoR* 5'-flankierenden Region führt (Abbildung 31).

Betrachtet man die detaillierte Sequenz in der Region von Position -316 bis -285 relativ zur Transkriptionsstartstelle (Abbildung 33), die sich innerhalb des Reporter-gen-Konstruktes mit der stärksten Aktivität (-449/-285) befindet, so fallen neben den bereits erwähnten Bindungsstellen für Sp1 und Ets-2 potentielle DNA-Motive für die Bindung von HNF-3 α , YY1, STAT und AP-2 auf. Im Reporter-gen-Assay zeigt das Konstrukt -449/-301 eine Aktivität, die signifikant höher ist als die der Kontrolle ($p < 0,001$). Im 5'-Bereich dieses Konstruktes befinden sich multiple Bindungsstellen für Ets-2, die anscheinend keine Rolle spielen, denn das Konstrukt -449/-316 zeigt nur eine der Kontrolle ähnliche Aktivität (Abbildung 17). Im 3'-Bereich dieses Fragments befinden sich dagegen zwei HNF-3 α Bindungsstellen und überlappend mit diesen beiden noch ein YY1 Motiv. HNF-3 α zeigt unter *in vivo*-Bedingungen keine Bindung an die *EpoR* 5'-flankierende Region (Abbildung 31). Laut TRANSFAC Professional kann auch HNF-3 β an diese Motive binden, dieser Faktor wird in SH-SY5Y Zellen aber nicht exprimiert (Abbildung 29). Da YY1 im ChIP-Assay an die *EpoR* 5'-flankierende Region bindet (Abbildung 31), könnte auch dieser Faktor für die Aktivität des Konstruktes -449/-301 verantwortlich sein. Das Konstrukt -449/-285 zeigt die höchste Aktivität in den Reporter-gen-Assays, die auch der Aktivität der vollständig untersuchten Region von Position -449 bis +33 entspricht. In diesem Konstrukt finden sich zusätzlich zu dem Konstrukt -449/-301 überlappende Bindungsstellen für STAT-Faktoren, Sp1, AP-2 und Ets-2 (Abbildung 33). Es scheint wahrscheinlich, dass an dieses Cluster von Bindungssequenzen ein oder mehrere Komplexe binden, die für die Aktivierung der Genexpression verantwortlich sind. Darunter muss sich auch die RNA-Polymerase befinden. Unklar bleibt, welcher einzelne Faktor daran beteiligt und für die Rekrutierung der Polymerase verantwortlich ist. Das bis zur Position -249 verlängerte Reporter-gen-Konstrukt weist eine verminderte Aktivierung auf, die – wie das mutierte Konstrukt zeigt – nicht allein von der GATA-Bindungsstelle abhängig ist. Es muss also mindestens ein weiterer Faktor für die Aktivitätsminderung verantwortlich sein. Dafür kommt nach der Sequenzanalyse YY1 in

Frage (Abbildung 33). Wenn YY1 an dieser Stelle (-253) inhibierend wirkt, könnte erklärt werden, warum das Konstrukt -286/-188 trotz vorhandener TBP-Bindungsstelle keine Aktivität aufweist. Der Transkriptionsfaktor YY1 kommt nach unseren Daten sowohl für eine positive als auch eine negative Regulation des *EpoR*-Gens in Frage. Tatsächlich wurde dieser Transkriptionsfaktor wegen seiner Fähigkeit neben der Transkriptionsinitiation, entweder als Aktivator oder als Repressor zu wirken, *Yin and Yang* genannt (zusammengefasst in [150]).

Bei dem zweiten Konstrukt, das den minimalen Promotor einschließt und über eine positive Aktivität verfügt (-75/+33), ist ein aktivierender Komplex aus AP-2 und Sp1 sowie Ets als inhibierendes Element denkbar. Bei der Regulation des humanen *PCI*-Gens (*protein C inhibitor*) wurde für die Sp1-Bindungsstelle eine starke Promotoraktivität sowie für die AP-2 Bindungsstelle eine Enhanceraktivität gezeigt [151]. Auch scheint ein Komplex aus Sp1, AP-2 und einem weiteren Faktor (*high-mobility group A1 protein*) für die Überexpression des Insulin-Rezeptors in Brustkrebszellen verantwortlich zu sein [152].

Auch wenn die Funktion der GATA-Transkriptionsfaktoren für die *EpoR*-Regulation nicht abschließend geklärt werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass diese Faktoren an den postulierten Komplexen direkt oder indirekt beteiligt sind. Die Literatur berichtet neben der bereits erwähnten Kooperation zwischen GATA-1 und Sp1 einige andere Beispiele zur Kooperation von GATA-Faktoren mit anderen Proteinen bei der Regulation verschiedener Gene. GATA-1 und GATA-2 interagieren z.B. mit PU.1, einem Faktor aus der Ets-Familie, wobei die Faktoren gegenseitig ihre Aktivität an myeloiden Promotoren inhibieren [153, 154]. Interagiert GATA-1 aber mit Fli-1, einem anderen Mitglied der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren, dann kommt es zu einer synergistischen Aktivierung von Megakaryozyten-spezifischen Promotoren [155]. Die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe lassen darauf schließen, dass GATA-2, Fli-1 und Elf-1 (ebenfalls aus der Ets-Familie) eine Schlüsselrolle in einem Komplex spielen, der für die Aktivierung der Transkription des *SCL*-Gens (*stem cell leukemia*) verantwortlich ist [156]. Die Arbeit von Youssoufian *et al.* zur Regulation des Maus-*EpoR* gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass Komplexe aus mehreren Transkriptionsfaktoren für die Genregulation des *EpoR* verantwortlich sein können. Die Arbeitsgruppe identifizierte einen Enhancer, der ca. 3 kb stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle des murinen *EpoR*-Gens lokalisiert ist [157]. Eine Sequenzanalyse mit

TRANSFAC Professional zeigt, dass in dieser Region ebenfalls gehäuft Bindungsstellen für die GATA-Transkriptionsfaktoren sowie für YY1, HNF-3 α/β , AP-1, Smad3, TBP und Sp1 vorhanden sind (Daten nicht gezeigt).

Die eigenen Reporter-gen-Assays zeigten die Relevanz verschiedener Bindungsstellen in der *EpoR* 5'-flankierenden Region für die *EpoR*-Genregulation. Dazu gehört u.a. die Sp1-Bindungsstelle, deren Mutation die Aktivität der regulatorischen Sequenzabschnitte verhinderte. Überexpressionsexperimente konnten in dieser Arbeit allerdings keine bedeutende Rolle von Sp1 bei der *EpoR*-Expression belegen.

5.5 Schlussfolgerung

Das Verständnis der *EpoR*-Regulation in neuronalen Zellen ist aus klinischer Perspektive ein hoch relevantes Forschungsthema. In dieser Arbeit wurde einerseits gezeigt, dass rEpo in SH-SY5Y Zellen keinen Einfluss auf die *EpoR*-Expression ausübt. Andererseits konnte bestätigt werden, dass die *EpoR*-Expression in neuronalen Zellen durch Hypoxie stimuliert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten ergänzende Informationen zum Expressionmuster von GATA-2, -3 und -4 sowie Sp1 während der Entwicklung des murinen Nervensystems gewonnen werden. GATA-2 wurde hier erstmals in der Mantelzone des Rückenmarks (E11,5-E18,5) sowie im Mittel- und Vorderhirn in späteren Stadien der Entwicklung (E14,5-E18,5) beschrieben. GATA-3 wurde ebenfalls erstmalig in späteren Entwicklungsstadien (E18,5) im Mittelhirn und im Pons nachgewiesen. GATA-4, das bisher noch nicht im ZNS beschrieben wurde, wurde im Cytoplasma von Zellen der Bodenplatte und des Notochords (E11,5-E14,5) detektiert, was auf eine Inaktivität des Faktors in diesem Entwicklungsstadium hinweist. Sp1 zeigte ein spezifisches Expressionsmuster, das sich auf das Neuroepithel (Ventrikularzone) des ZNS beschränkte. Außerdem wurde gezeigt, dass die Sp1-Expression vor allem im Entwicklungsstadium E11,5 mit GATA-2 sowohl im Rückenmark als auch im Gehirn, in einzelnen Zellen aber auch mit GATA-3 co-lokalisiert. Außerdem wurde hier zum ersten Mal gezeigt, dass die Expression von GATA-2, -3 und -4 in Zellen mit neuronalem Phänotyp unter

Hypoxie stimuliert wird.

Die Regulation des *EpoR*-Gens in neuronalen Zellen unterscheidet sich von der in hämatopoietischen Zellen hinsichtlich der Bedeutung des minimalen Promotors und der GATA-Faktoren. Während in hämatopoietischen Zellen GATA-1, das in neuronalen Zellen nicht exprimiert wird, durch Bindung an den minimalen Promotor (-75/+33 relativ zur Transkriptionsstartstelle) die *EpoR*-Expression stimuliert, konnte für GATA-2, -3 und -4 in dieser Arbeit zwar eine Aktivität an diesem Element in Reporterassays, aber keine bedeutende Rolle bei der *EpoR*-Expression nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Reporter- und des ChIP-Assays zusammen mit der genauen Sequenzanalyse des *EpoR*-Gens weisen darauf hin, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren an die *EpoR* 5'-flankierende Region binden und eventuell in einem oder mehreren Komplexen das *EpoR*-Gen regulieren. Die Kandidaten, die einer näheren Charakterisierung bedürfen, sind Transkriptionsfaktoren aus den Sp-, Ets- und STAT-Familien sowie AP-2, YY1 und TBP. Eine Beteiligung der GATA-Transkriptionsfaktoren an solchen Komplexen könnte die nachgewiesenen Bindungsmuster in den EMSA-Experimenten erklären.

6 LITERATUR

- [1] Jelkmann, W. (1992): Erythropoietin: structure, control of production, and function, *Physiol Rev* 72 [2], pp. 449-89.
- [2] Dame, C.; Fahnenstich, H.; Freitag, P.; Hofmann, D.; Abdul-Nour, T.; Bartmann, P. and Fandrey, J. (1998): Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue, *Blood* 92 [9], pp. 3218-25.
- [3] Juul, S. E.; Yachnis, A. T. and Christensen, R. D. (1998): Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus, *Early Hum Dev* 52 [3], pp. 235-49.
- [4] Dame, C.; Bartmann, P.; Wolber, E.; Fahnenstich, H.; Hofmann, D. and Fandrey, J. (2000): Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system, *Brain Res Dev Brain Res* 125 [1-2], pp. 69-74.
- [5] Jelkmann, W. (2005): Effects of erythropoietin on brain function, *Curr Pharm Biotechnol* 6 [1], pp. 65-79.
- [6] Morishita, E.; Masuda, S.; Nagao, M.; Yasuda, Y. and Sasaki, R. (1997): Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death, *Neuroscience* 76 [1], pp. 105-16.
- [7] Sakanaka, M.; Wen, T. C.; Matsuda, S.; Masuda, S.; Morishita, E.; Nagao, M. and Sasaki, R. (1998): In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [8], pp. 4635-40.
- [8] Koshimura, K.; Murakami, Y.; Sohmiya, M.; Tanaka, J. and Kato, Y. (1999): Effects of erythropoietin on neuronal activity, *J Neurochem* 72 [6], pp. 2565-72.
- [9] Brines, M. L.; Ghezzi, P.; Keenan, S.; Agnello, D.; de Lanerolle, N. C.; Cerami, C.; Itri, L. M. and Cerami, A. (2000): Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [19], pp. 10526-31.
- [10] Sadamoto, Y.; Igase, K.; Sakanaka, M.; Sato, K.; Otsuka, H.; Sakaki, S.; Masuda, S. and Sasaki, R. (1998): Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery, *Biochem Biophys Res Commun* 253 [1], pp. 26-32.
- [11] Konishi, Y.; Chui, D. H.; Hirose, H.; Kunishita, T. and Tabira, T. (1993): Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo, *Brain Res* 609 [1-2], pp. 29-35.
- [12] Buemi, M.; Grasso, G.; Corica, F.; Calapai, G.; Salpietro, F. M.; Casuscelli, T.; Sfacteria, A.; Aloisi, C.; Alafaci, C.; Sturiale, A.; Frisina, N. and Tomasello, F. (2000): In vivo evidence that erythropoietin has a neuroprotective effect during subarachnoid hemorrhage, *Eur J Pharmacol* 392 [1-2], pp. 31-4.
- [13] Smith, K. J.; Bleyer, A. J.; Little, W. C. and Sane, D. C. (2003): The cardiovascular

- effects of erythropoietin, *Cardiovasc Res* 59 [3], pp. 538-48.
- [14] Bogoyevitch, M. A. (2004): An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection, *Cardiovasc Res* 63 [2], pp. 208-16.
- [15] Suzuki, N.; Ohneda, O.; Takahashi, S.; Higuchi, M.; Mukai, H. Y.; Nakahata, T.; Imagawa, S. and Yamamoto, M. (2002): Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality, *Blood* 100 [7], pp. 2279-88.
- [16] Yu, X.; Shacka, J. J.; Eells, J. B.; Suarez-Quian, C.; Przygodzki, R. M.; Beleslin-Cokic, B.; Lin, C. S.; Nikodem, V. M.; Hempstead, B.; Flanders, K. C.; Costantini, F. and Noguchi, C. T. (2002): Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development, *Development* 129 [2], pp. 505-16.
- [17] Tsai, P. T.; Ohab, J. J.; Kertesz, N.; Groszer, M.; Matter, C.; Gao, J.; Liu, X.; Wu, H. and Carmichael, S. T. (2006): A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery, *J Neurosci* 26 [4], pp. 1269-74.
- [18] D'Andrea, A. D.; Lodish, H. F. and Wong, G. G. (1989): Expression cloning of the murine erythropoietin receptor, *Cell* 57 [2], pp. 277-85.
- [19] Bazan, J. F. (1989): A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain, *Biochem Biophys Res Commun* 164 [2], pp. 788-95.
- [20] Constantinescu, S. N.; Ghaffari, S. and Lodish, H. F. (1999): The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction, *Trends Endocrinol Metab* 10 [1], pp. 18-23.
- [21] Bazan, J. F. (1990): Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [18], pp. 6934-8.
- [22] Cosman, D.; Lyman, S. D.; Idzerda, R. L.; Beckmann, M. P.; Park, L. S.; Goodwin, R. G. and March, C. J. (1990): A new cytokine receptor superfamily, *Trends Biochem Sci* 15 [7], pp. 265-70.
- [23] Fukunaga, R.; Ishizaka-Ikeda, E.; Seto, Y. and Nagata, S. (1990): Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor, *Cell* 61 [2], pp. 341-50.
- [24] Vigon, I.; Mornon, J. P.; Cocault, L.; Mitjavila, M. T.; Tambourin, P.; Gisselbrecht, S. and Souyri, M. (1992): Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [12], pp. 5640-4.
- [25] Witthuhn, B. A.; Quelle, F. W.; Silvennoinen, O.; Yi, T.; Tang, B.; Miura, O. and Ihle, J. N. (1993): JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin, *Cell* 74 [2], pp. 227-36.
- [26] Lacombe, C. and Mayeux, P. (1998): Biology of erythropoietin, *Haematologica* 83 [8], pp. 724-32.

-
- [27] Klingmuller, U.; Lorenz, U.; Cantley, L. C.; Neel, B. G. and Lodish, H. F. (1995): Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals, *Cell* 80 [5], pp. 729-38.
- [28] Wu, H.; Klingmuller, U.; Acurio, A.; Hsiao, J. G. and Lodish, H. F. (1997): Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [5], pp. 1806-10.
- [29] Jubinsky, P. T.; Krijanovski, O. I.; Nathan, D. G.; Tavernier, J. and Sieff, C. A. (1997): The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor, *Blood* 90 [5], pp. 1867-73.
- [30] Hanazono, Y.; Sasaki, K.; Nitta, H.; Yazaki, Y. and Hirai, H. (1995): Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the beta chain of the GM-CSF receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 208 [3], pp. 1060-6.
- [31] Chin, H.; Wakao, H.; Miyajima, A.; Kamiyama, R.; Miyasaka, N. and Miura, O. (1997): Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the interleukin-3 receptor beta subunit (betaIL3) and recruitment of Stat5 to possible Stat5-docking sites in betaIL3, *Blood* 89 [12], pp. 4327-36.
- [32] Brines, M.; Grasso, G.; Fiordaliso, F.; Sfacteria, A.; Ghezzi, P.; Fratelli, M.; Latini, R.; Xie, Q. W.; Smart, J.; Su-Rick, C. J.; Pobre, E.; Diaz, D.; Gomez, D.; Hand, C.; Coleman, T. and Cerami, A. (2004): Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [41], pp. 14907-12.
- [33] Fisher, J. W. (1997): Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects, *Proc Soc Exp Biol Med* 216 [3], pp. 358-69.
- [34] Orlic, D.; Anderson, S.; Biesecker, L. G.; Sorrentino, B. P. and Bodine, D. M. (1995): Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [10], pp. 4601-5.
- [35] Ohneda, O.; Yanai, N. and Obinata, M. (1993): Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis, *Exp Cell Res* 208 [1], pp. 327-31.
- [36] Fraser, J. K.; Tan, A. S.; Lin, F. K. and Berridge, M. V. (1989): Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes, *Exp Hematol* 17 [1], pp. 10-6.
- [37] Westenfelder, C.; Biddle, D. L. and Baranowski, R. L. (1999): Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors, *Kidney Int* 55 [3], pp. 808-20.
- [38] Juul, S. E.; Joyce, A. E.; Zhao, Y. and Ledbetter, D. J. (1999): Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates, *Pediatr Res* 46 [3], pp. 263-8.
- [39] Juul, S. E.; Anderson, D. K.; Li, Y. and Christensen, R. D. (1998): Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system, *Pediatr Res* 43 [1], pp. 40-9.
- [40] Bocker-Meffert, S.; Rosenstiel, P.; Rohl, C.; Warneke, N.; Held-Feindt, J.; Sievers, J.

- and Lucius, R. (2002): Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 [6], pp. 2021-6.
- [41] Yasuda, Y.; Masuda, S.; Chikuma, M.; Inoue, K.; Nagao, M. and Sasaki, R. (1998): Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis, *J Biol Chem* 273 [39], pp. 25381-7.
- [42] Yokomizo, R.; Matsuzaki, S.; Uehara, S.; Murakami, T.; Yaegashi, N. and Okamura, K. (2002): Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle, *Mol Hum Reprod* 8 [5], pp. 441-6.
- [43] Koury, M. J.; Bondurant, M. C.; Graber, S. E. and Sawyer, S. T. (1988): Erythropoietin messenger RNA levels in developing mice and transfer of ¹²⁵I-erythropoietin by the placenta, *J Clin Invest* 82 [1], pp. 154-9.
- [44] Sawyer, S. T.; Krantz, S. B. and Sawada, K. (1989): Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta, *Blood* 74 [1], pp. 103-9.
- [45] Conrad, K. P.; Benyo, D. F.; Westerhausen-Larsen, A. and Miles, T. M. (1996): Expression of erythropoietin by the human placenta, *Faseb J* 10 [7], pp. 760-8.
- [46] Kim, M. J.; Bogic, L.; Cheung, C. Y. and Brace, R. A. (2001): Placental expression of erythropoietin mRNA, protein and receptor in sheep, *Placenta* 22 [5], pp. 484-9.
- [47] Mioni, R.; Gottardello, F.; Bordon, P.; Montini, G. and Foresta, C. (1992): Evidence for specific binding and stimulatory effects of recombinant human erythropoietin on isolated adult rat Leydig cells, *Acta Endocrinol (Copenh)* 127 [5], pp. 459-65.
- [48] Kobayashi, T.; Yanase, H.; Iwanaga, T.; Sasaki, R. and Nagao, M. (2002): Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs, *Biochem Biophys Res Commun* 296 [1], pp. 145-51.
- [49] Ogilvie, M.; Yu, X.; Nicolas-Metral, V.; Pulido, S. M.; Liu, C.; Ruegg, U. T. and Noguchi, C. T. (2000): Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts, *J Biol Chem* 275 [50], pp. 39754-61.
- [50] Wu, H.; Lee, S. H.; Gao, J.; Liu, X. and Iruela-Arispe, M. L. (1999): Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis, *Development* 126 [16], pp. 3597-605.
- [51] Digicaylioglu, M.; Bichet, S.; Marti, H. H.; Wenger, R. H.; Rivas, L. A.; Bauer, C. and Gassmann, M. (1995): Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [9], pp. 3717-20.
- [52] Marti, H. H.; Wenger, R. H.; Rivas, L. A.; Straumann, U.; Digicaylioglu, M.; Henn, V.; Yonekawa, Y.; Bauer, C. and Gassmann, M. (1996): Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain, *Eur J Neurosci* 8 [4], pp. 666-76.
- [53] Liu, C.; Shen, K.; Liu, Z. and Noguchi, C. T. (1997): Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain, *J Biol Chem* 272 [51], pp. 32395-400.
- [54] Knabe, W.; Siren, A. L.; Ehrenreich, H. and Kuhn, H. J. (2005): Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing spinal cord and dorsal root ganglia, *Anat Embryol (Berl)* 210 [3], pp. 209-19.
- [55] Juul, S. E.; Yachnis, A. T.; Rojiani, A. M. and Christensen, R. D. (1999):

- Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain, *Pediatr Dev Pathol* 2 [2], pp. 148-58.
- [56] Komatsu, N. and Fujita, H. (1993): Induced megakaryocytic maturation of the human leukemia cell line UT-7 results in down-modulation of erythropoietin receptor gene expression, *Cancer Res* 53 [5], pp. 1156-61.
- [57] Migliaccio, A. R.; Jiang, Y.; Migliaccio, G.; Nicolis, S.; Crotta, S.; Ronchi, A.; Ottolenghi, S. and Adamson, J. W. (1993): Transcriptional and posttranscriptional regulation of the expression of the erythropoietin receptor gene in human erythropoietin-responsive cell lines, *Blood* 82 [12], pp. 3760-9.
- [58] Migliaccio, A. R.; Migliaccio, G.; D'Andrea, A.; Baiocchi, M.; Crotta, S.; Nicolis, S.; Ottolenghi, S. and Adamson, J. W. (1991): Response to erythropoietin in erythroid subclones of the factor-dependent cell line 32D is determined by translocation of the erythropoietin receptor to the cell surface, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 [24], pp. 11086-90.
- [59] Maouche, L.; Cartron, J. P. and Chretien, S. (1994): Different domains regulate the human erythropoietin receptor gene transcription, *Nucleic Acids Res* 22 [3], pp. 338-46.
- [60] Zon, L. I.; Youssoufian, H.; Mather, C.; Lodish, H. F. and Orkin, S. H. (1991): Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 [23], pp. 10638-41.
- [61] Chiba, T.; Ikawa, Y. and Todokoro, K. (1991): GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression, *Nucleic Acids Res* 19 [14], pp. 3843-8.
- [62] Chin, K.; Oda, N.; Shen, K. and Noguchi, C. T. (1995): Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs, *Nucleic Acids Res* 23 [15], pp. 3041-9.
- [63] Lowry, J. A. and Mackay, J. P. (2006): GATA-1: one protein, many partners, *Int J Biochem Cell Biol* 38 [1], pp. 6-11.
- [64] Lowry, J. A. and Atchley, W. R. (2000): Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain, *J Mol Evol* 50 [2], pp. 103-15.
- [65] Wall, L.; deBoer, E. and Grosveld, F. (1988): The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein, *Genes Dev* 2 [9], pp. 1089-100.
- [66] Plumb, M.; Frampton, J.; Wainwright, H.; Walker, M.; Macleod, K.; Goodwin, G. and Harrison, P. (1989): GATAAG; a cis-control region binding an erythroid-specific nuclear factor with a role in globin and non-globin gene expression, *Nucleic Acids Res* 17 [1], pp. 73-92.
- [67] Watt, P.; Lamb, P.; Squire, L. and Proudfoot, N. (1990): A factor binding GATAAG confers tissue specificity on the promoter of the human zeta-globin gene, *Nucleic Acids Res* 18 [6], pp. 1339-50.
- [68] Gong, Q. H.; Stern, J. and Dean, A. (1991): Transcriptional role of a conserved

- GATA-1 site in the human epsilon-globin gene promoter, *Mol Cell Biol* 11 [5], pp. 2558-66.
- [69] Mignotte, V.; Wall, L.; deBoer, E.; Grosveld, F. and Romeo, P. H. (1989): Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene, *Nucleic Acids Res* 17 [1], pp. 37-54.
- [70] Wilson, D. B.; Dorfman, D. M. and Orkin, S. H. (1990): A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells, *Mol Cell Biol* 10 [9], pp. 4854-62.
- [71] Tsai, S. F.; Strauss, E. and Orkin, S. H. (1991): Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter, *Genes Dev* 5 [6], pp. 919-31.
- [72] Grass, J. A.; Boyer, M. E.; Pal, S.; Wu, J.; Weiss, M. J. and Bresnick, E. H. (2003): GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [15], pp. 8811-6.
- [73] Pata, I.; Studer, M.; van Doorninck, J. H.; Briscoe, J.; Kuuse, S.; Engel, J. D.; Grosveld, F. and Karis, A. (1999): The transcription factor GATA3 is a downstream effector of *Hoxb1* specification in rhombomere 4, *Development* 126 [23], pp. 5523-31.
- [74] Kuo, C. T.; Morrissey, E. E.; Anandappa, R.; Sigrist, K.; Lu, M. M.; Parmacek, M. S.; Soudais, C. and Leiden, J. M. (1997): GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation, *Genes Dev* 11 [8], pp. 1048-60.
- [75] Molkentin, J. D.; Lin, Q.; Duncan, S. A. and Olson, E. N. (1997): Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis, *Genes Dev* 11 [8], pp. 1061-72.
- [76] Morrissey, E. E.; Tang, Z.; Sigrist, K.; Lu, M. M.; Jiang, F.; Ip, H. S. and Parmacek, M. S. (1998): GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo, *Genes Dev* 12 [22], pp. 3579-90.
- [77] Martin, D. I. and Orkin, S. H. (1990): Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1, *Genes Dev* 4 [11], pp. 1886-98.
- [78] Zon, L. I.; Mather, C.; Burgess, S.; Bolce, M. E.; Harland, R. M. and Orkin, S. H. (1991): Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 [23], pp. 10642-6.
- [79] Orkin, S. H. (1998): Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis, *Int J Dev Biol* 42 [7], pp. 927-34.
- [80] Arceci, R. J.; King, A. A.; Simon, M. C.; Orkin, S. H. and Wilson, D. B. (1993): Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart, *Mol Cell Biol* 13 [4], pp. 2235-46.
- [81] Kelley, C.; Blumberg, H.; Zon, L. I. and Evans, T. (1993): GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart, *Development* 118 [3], pp. 817-27.

-
- [82] Laverriere, A. C.; MacNeill, C.; Mueller, C.; Poelmann, R. E.; Burch, J. B. and Evans, T. (1994): GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut, *J Biol Chem* 269 [37], pp. 23177-84.
- [83] Morrissey, E. E.; Ip, H. S.; Tang, Z.; Lu, M. M. and Parmacek, M. S. (1997): GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development, *Dev Biol* 183 [1], pp. 21-36.
- [84] Suzuki, E.; Evans, T.; Lowry, J.; Truong, L.; Bell, D. W.; Testa, J. R. and Walsh, K. (1996): The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals, *Genomics* 38 [3], pp. 283-90.
- [85] Nardelli, J.; Thiesson, D.; Fujiwara, Y.; Tsai, F. Y. and Orkin, S. H. (1999): Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system, *Dev Biol* 210 [2], pp. 305-21.
- [86] Lawson, M. A. and Mellon, P. L. (1998): Expression of GATA-4 in migrating gonadotropin-releasing neurons of the developing mouse, *Mol Cell Endocrinol* 140 [1-2], pp. 157-61.
- [87] Nemer, G. and Nemer, M. (2003): Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6, *Dev Biol* 254 [1], pp. 131-48.
- [88] Tsai, F. Y.; Keller, G.; Kuo, F. C.; Weiss, M.; Chen, J.; Rosenblatt, M.; Alt, F. W. and Orkin, S. H. (1994): An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2, *Nature* 371 [6494], pp. 221-6.
- [89] Zhou, Y.; Yamamoto, M. and Engel, J. D. (2000): GATA2 is required for the generation of V2 interneurons, *Development* 127 [17], pp. 3829-38.
- [90] Craven, S. E.; Lim, K. C.; Ye, W.; Engel, J. D.; de Sauvage, F. and Rosenthal, A. (2004): Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog, *Development* 131 [5], pp. 1165-73.
- [91] Lim, K. C.; Lakshmanan, G.; Crawford, S. E.; Gu, Y.; Grosveld, F. and Engel, J. D. (2000): Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system, *Nat Genet* 25 [2], pp. 209-12.
- [92] George, K. M.; Leonard, M. W.; Roth, M. E.; Lieuw, K. H.; Kioussis, D.; Grosveld, F. and Engel, J. D. (1994): Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene, *Development* 120 [9], pp. 2673-86.
- [93] Karis, A.; Pata, I.; van Doorninck, J. H.; Grosveld, F.; de Zeeuw, C. I.; de Caprona, D. and Fritsch, B. (2001): Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear, *J Comp Neurol* 429 [4], pp. 615-30.
- [94] van Doorninck, J. H.; van Der Wees, J.; Karis, A.; Goedknecht, E.; Engel, J. D.; Coesmans, M.; Rutteman, M.; Grosveld, F. and De Zeeuw, C. I. (1999): GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei, *J Neurosci* 19 [12], p. RC12.
- [95] Koutsourakis, M.; Langeveld, A.; Patient, R.; Beddington, R. and Grosveld, F. (1999):

- The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development, *Development* 126 [9], pp. 723-32.
- [96] Imagawa, S.; Suzuki, N.; Ohmine, K.; Obara, N.; Mukai, H. Y.; Ozawa, K.; Yamamoto, M. and Nagasawa, T. (2002): GATA suppresses erythropoietin gene expression through GATA site in mouse erythropoietin gene promoter, *Int J Hematol* 75 [4], pp. 376-81.
- [97] La Ferla, K.; Reimann, C.; Jelkmann, W. and Hellwig-Burgel, T. (2002): Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB, *Faseb J* 16 [13], pp. 1811-3.
- [98] Dame, C.; Sola, M. C.; Lim, K. C.; Leach, K. M.; Fandrey, J.; Ma, Y.; Knopfle, G.; Engel, J. D. and Bungert, J. (2004): Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4, *J Biol Chem* 279 [4], pp. 2955-61.
- [99] Sapetschnig, A.; Koch, F.; Rischitor, G.; Mennenga, T. and Suske, G. (2004): Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression, *J Biol Chem* 279 [40], pp. 42095-105.
- [100] Ikonomi, P.; Rivera, C. E.; Riordan, M.; Washington, G.; Schechter, A. N. and Noguchi, C. T. (2000): Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation, *Exp Hematol* 28 [12], pp. 1423-31.
- [101] Ko, L. J.; Yamamoto, M.; Leonard, M. W.; George, K. M.; Ting, P. and Engel, J. D. (1991): Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer, *Mol Cell Biol* 11 [5], pp. 2778-84.
- [102] Wagner, N.; Wagner, K. D.; Theres, H.; Englert, C.; Schedl, A. and Scholz, H. (2005): Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1, *Genes Dev* 19 [21], pp. 2631-42.
- [103] Leonard, M.; Brice, M.; Engel, J. D. and Papayannopoulou, T. (1993): Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation, *Blood* 82 [4], pp. 1071-9.
- [104] Bai, Y.; Akiyama, Y.; Nagasaki, H.; Yagi, O. K.; Kikuchi, Y.; Saito, N.; Takeshita, K.; Iwai, T. and Yuasa, Y. (2000): Distinct expression of CDX2 and GATA4/5, development-related genes, in human gastric cancer cell lines, *Mol Carcinog* 28 [3], pp. 184-8.
- [105] Jover, R.; Bort, R.; Gomez-Lechon, M. J. and Castell, J. V. (2001): Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting, *Hepatology* 33 [3], pp. 668-75.
- [106] Halmos, B.; Basseres, D. S.; Monti, S.; D'Alo, F.; Dayaram, T.; Ferenczi, K.; Wouters, B. J.; Huettner, C. S.; Golub, T. R. and Tenen, D. G. (2004): A transcriptional profiling study of CCAAT/enhancer binding protein targets identifies hepatocyte nuclear factor 3 beta as a novel tumor suppressor in lung cancer, *Cancer Res* 64 [12], pp. 4137-47.
- [107] Li, X.; Lu, J. Y.; Zhao, L. Q.; Wang, X. Q.; Liu, G. L.; Liu, Z.; Zhou, C. N.; Wu, M. and Liu, Z. H. (2003): Overexpression of ETS2 in human esophageal squamous cell

- carcinoma, *World J Gastroenterol* 9 [2], pp. 205-8.
- [108] Baskiewicz-Masiuk, M.; Masiuk, M.; Czajka, R. and Machalinski, B. (2003): The role of STAT5 proteins in the regulation of normal hematopoiesis in a cord blood model, *Cell Mol Biol Lett* 8 [2], pp. 317-31.
- [109] Wolfrain, L. A.; Fernandez, T. M.; Mamura, M.; Fuller, W. L.; Kumar, R.; Cole, D. E.; Byfield, S.; Felici, A.; Flanders, K. C.; Walz, T. M.; Roberts, A. B.; Aplan, P. D.; Balis, F. M. and Letterio, J. J. (2004): Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia, *N Engl J Med* 351 [6], pp. 552-9.
- [110] Santiago, F. S.; Lowe, H. C.; Bobryshev, Y. V. and Khachigian, L. M. (2001): Induction of the transcriptional repressor Yin Yang-1 by vascular cell injury. Autocrine/paracrine role of endogenous fibroblast growth factor-2, *J Biol Chem* 276 [44], pp. 41143-9.
- [111] Methe, H.; Wiegand, D.; Welsch, U.; Krombach, F.; Meiser, B.; Nabauer, M. and Koglin, J. (2005): Peripheral expansion of circulating T-helper 1 cells predicts coronary endothelial dysfunction after cardiac transplantation, *J Heart Lung Transplant* 24 [7], pp. 833-40.
- [112] Wang, G.; Bunnell, B. A.; Painter, R. G.; Quiniones, B. C.; Tom, S.; Lanson, N. A., Jr.; Spees, J. L.; Bertucci, D.; Peister, A.; Weiss, D. J.; Valentine, V. G.; Prockop, D. J. and Kolls, J. K. (2005): Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [1], pp. 186-91.
- [113] Kozak, M. (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic Acids Res* 15 [20], pp. 8125-48.
- [114] Dame, C.; Wolber, E. M.; Freitag, P.; Hofmann, D.; Bartmann, P. and Fandrey, J. (2003): Thrombopoietin gene expression in the developing human central nervous system, *Brain Res Dev Brain Res* 143 [2], pp. 217-23.
- [115] Palaszewski, I., Dame, C. (2005): Homo sapiens GATA binding protein 4 (GATA4) mRNA, complete cds. GenBank accession number AY740706.
- [116] Urban, A.; Neukirchen, S. and Jaeger, K. E. (1997): A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR, *Nucleic Acids Res* 25 [11], pp. 2227-8.
- [117] Kaufmann, M. H. (2004): *The Atlas of Mouse Development*, Elsevier Academic Press, London, UK; San Diego, CA, USA, ISBN: 0-12-402035-6.
- [118] Pahlman, S.; Mamaeva, S.; Meyerson, G.; Mattsson, M. E.; Bjelfman, C.; Ortoft, E. and Hammerling, U. (1990): Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function, *Acta Physiol Scand Suppl* 592, pp. 25-37.
- [119] Pregi, N.; Vittori, D.; Perez, G.; Leiros, C. P. and Nesse, A. (2006): Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Biochim Biophys Acta* 1763 [2], pp. 238-46.
- [120] Um, M. and Lodish, H. F. (2006): Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways, *J Biol Chem* 281 [9], pp. 5648-56.

-
- [121] Stolze, I.; Berchner-Pfannschmidt, U.; Freitag, P.; Wotzlaw, C.; Rossler, J.; Frede, S.; Acker, H. and Fandrey, J. (2002): Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells, *Blood* 100 [7], pp. 2623-8.
- [122] Elliott, S.; Busse, L.; Bass, M. B.; Lu, H.; Sarosi, I.; Sinclair, A. M.; Spahr, C.; Um, M.; Van, G. and Begley, C. G. (2006): Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression, *Blood* 107 [5], pp. 1892-5.
- [123] Kaur, N.; Wohlhueter, A. L. and Halvorsen, S. W. (2002): Activation and inactivation of signal transducers and activators of transcription by ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cells, *Cell Signal* 14 [5], pp. 419-29.
- [124] Ko, J. L.; Liu, H. C. and Loh, H. H. (2003): Role of an AP-2-like element in transcriptional regulation of mouse micro-opioid receptor gene, *Brain Res Mol Brain Res* 112 [1-2], pp. 153-62.
- [125] Bernaudin, M.; Marti, H. H.; Roussel, S.; Divoux, D.; Nouvelot, A.; MacKenzie, E. T. and Petit, E. (1999): A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice, *J Cereb Blood Flow Metab* 19 [6], pp. 643-51.
- [126] Siren, A. L.; Fratelli, M.; Brines, M.; Goemans, C.; Casagrande, S.; Lewczuk, P.; Keenan, S.; Gleiter, C.; Pasquali, C.; Capobianco, A.; Mennini, T.; Heumann, R.; Cerami, A.; Ehrenreich, H. and Ghezzi, P. (2001): Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [7], pp. 4044-9.
- [127] Henke, M.; Verma, A. and Acs, G. (2006): Erythropoietin receptors on cancer cells: exciting perspectives, difficult to appreciate, *Blood* 108 [3], pp. 1107-8; author reply 1108-9.
- [128] Knabe, W.; Knerlich, F.; Washausen, S.; Kietzmann, T.; Siren, A. L.; Brunnett, G.; Kuhn, H. J. and Ehrenreich, H. (2004): Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain, *Anat Embryol (Berl)* 207 [6], pp. 503-12.
- [129] Siren, A. L.; Knerlich, F.; Poser, W.; Gleiter, C. H.; Bruck, W. and Ehrenreich, H. (2001): Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain, *Acta Neuropathol (Berl)* 101 [3], pp. 271-6.
- [130] Liu, Z. Y.; Chin, K. and Noguchi, C. T. (1994): Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice, *Dev Biol* 166 [1], pp. 159-69.
- [131] Van Esch, H.; Groenen, P.; Nesbit, M. A.; Schuffenhauer, S.; Lichtner, P.; Vanderlinden, G.; Harding, B.; Beetz, R.; Bilous, R. W.; Holdaway, I.; Shaw, N. J.; Fryns, J. P.; Van de Ven, W.; Thakker, R. V. and Devriendt, K. (2000): GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome, *Nature* 406 [6794], pp. 419-22.
- [132] El Wakil, A.; Francius, C.; Wolff, A.; Pleau-Varet, J. and Nardelli, J. (2006): The GATA2 transcription factor negatively regulates the proliferation of neuronal progenitors, *Development* 133 [11], pp. 2155-65.
- [133] Briggs, M. R.; Kadonaga, J. T.; Bell, S. P. and Tjian, R. (1986): Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1, *Science* 234 [4772], pp. 47-52.
- [134] Saffer, J. D.; Jackson, S. P. and Annarella, M. B. (1991): Developmental expression of

- Sp1 in the mouse, *Mol Cell Biol* 11 [4], pp. 2189-99.
- [135] Lu, J. R.; McKinsey, T. A.; Xu, H.; Wang, D. Z.; Richardson, J. A. and Olson, E. N. (1999): FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors, *Mol Cell Biol* 19 [6], pp. 4495-502.
- [136] Beleslin-Cokic, B. B.; Cokic, V. P.; Yu, X.; Weksler, B. B.; Schechter, A. N. and Noguchi, C. T. (2004): Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells, *Blood* 104 [7], pp. 2073-80.
- [137] Spandou, E.; Papoutsopoulou, S.; Soubasi, V.; Karkavelas, G.; Simeonidou, C.; Kremenopoulos, G. and Guiba-Tziampiri, O. (2004): Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain, *Brain Res* 1021 [2], pp. 167-72.
- [138] Park, A. M.; Nagase, H.; Vinod Kumar, S. and Suzuki, Y. J. (2006): Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- [139] Aher, S. M. and Ohlsson, A. (2006): Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants, *Cochrane Database Syst Rev* 3, p. CD004865.
- [140] Brown, M. S.; Baron, A. E.; France, E. K. and Hamman, R. F. (2006): Association between higher cumulative doses of recombinant erythropoietin and risk for retinopathy of prematurity, *J Aapos* 10 [2], pp. 143-9.
- [141] Boogaerts, M.; Mittelman, M. and Vaupel, P. (2005): Beyond anaemia management: evolving role of erythropoietin therapy in neurological disorders, multiple myeloma and tumour hypoxia models, *Oncology* 69 Suppl 2, pp. 22-30.
- [142] Solar, P., Feldman, L., Sytkowski, A.J. (2006): Human ovarian cancer cells treated with erythropoietin exhibit paclitaxel-resistance, 7th International Lübeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin and other Hemopoietic Growth Factors, Lübeck, Germany.
- [143] Bohlius, J.; Weingart, O.; Trelle, S. and Engert, A. (2006): Cancer-related anemia and recombinant human erythropoietin--an updated overview, *Nat Clin Pract Oncol* 3 [3], pp. 152-64.
- [144] Verdier, F.; Gomez, S.; Lacombe, C. and Mayeux, P. (2006): Selected anti-Epo receptor antibodies predict Epo receptor expression, *Blood* 108 [3], p. 1106; author reply 1107.
- [145] Kaczynski, J.; Cook, T. and Urrutia, R. (2003): Sp1- and Kruppel-like transcription factors, *Genome Biol* 4 [2], p. 206.
- [146] Minegishi, N.; Suzuki, N.; Kawatani, Y.; Shimizu, R. and Yamamoto, M. (2005): Rapid turnover of GATA-2 via ubiquitin-proteasome protein degradation pathway, *Genes Cells* 10 [7], pp. 693-704.
- [147] Fluck, C. E. and Miller, W. L. (2004): GATA-4 and GATA-6 modulate tissue-specific transcription of the human gene for P450c17 by direct interaction with Sp1, *Mol Endocrinol* 18 [5], pp. 1144-57.

-
- [148] Oikawa, T. and Yamada, T. (2003): Molecular biology of the Ets family of transcription factors, *Gene* 303, pp. 11-34.
- [149] Lulli, V.; Romania, P.; Morsilli, O.; Gabbianelli, M.; Pagliuca, A.; Mazzeo, S.; Testa, U.; Peschle, C. and Marziali, G. (2006): Overexpression of Ets-1 in human hematopoietic progenitor cells blocks erythroid and promotes megakaryocytic differentiation, *Cell Death Differ* 13 [7], pp. 1064-74.
- [150] Gordon, S.; Akopyan, G.; Garban, H. and Bonavida, B. (2006): Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology, *Oncogene* 25 [8], pp. 1125-42.
- [151] Hayashi, T.; Usui, M.; Nishioka, J.; Zhang, Z. X. and Suzuki, K. (1998): Regulation of the human protein C inhibitor gene expression in HepG2 cells: role of Sp1 and AP2, *Biochem J* 332 (Pt 2), pp. 573-82.
- [152] Paonessa, F.; Foti, D.; Costa, V.; Chiefari, E.; Brunetti, G.; Leone, F.; Luciano, F.; Wu, F.; Lee, A. S.; Gulletta, E.; Fusco, A. and Brunetti, A. (2006): Activator protein-2 overexpression accounts for increased insulin receptor expression in human breast cancer, *Cancer Res* 66 [10], pp. 5085-93.
- [153] Zhang, P.; Behre, G.; Pan, J.; Iwama, A.; Wara-Aswapati, N.; Radomska, H. S.; Auron, P. E.; Tenen, D. G. and Sun, Z. (1999): Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [15], pp. 8705-10.
- [154] Zhang, P.; Zhang, X.; Iwama, A.; Yu, C.; Smith, K. A.; Mueller, B. U.; Narravula, S.; Torbett, B. E.; Orkin, S. H. and Tenen, D. G. (2000): PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding, *Blood* 96 [8], pp. 2641-8.
- [155] Eisbacher, M.; Holmes, M. L.; Newton, A.; Hogg, P. J.; Khachigian, L. M.; Crossley, M. and Chong, B. H. (2003): Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding, *Mol Cell Biol* 23 [10], pp. 3427-41.
- [156] Gottgens, B.; Nastos, A.; Kinston, S.; Piltz, S.; Delabesse, E. C.; Stanley, M.; Sanchez, M. J.; Ciau-Uitz, A.; Patient, R. and Green, A. R. (2002): Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors, *Embo J* 21 [12], pp. 3039-50.
- [157] Youssoufian, H. (1994): Further characterization of cis-acting regulatory sequences in the genomic locus of the murine erythropoietin receptor: evidence for stage-specific regulation, *Blood* 83 [5], pp. 1428-35.

Publikationen, Preise, Stipendien

- In Fachzeitschriften Bigger BW, Tolmachov O, Collombet J-M, Fragkos M, **Palaszewski I**, Coutelle C. An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem*, 2001, 276(25):23018-27
- Tolmachov O, **Palaszewski I**, Bigger B, Coutelle C. RecET driven chromosomal gene targeting to generate a RecA deficient Escherichia coli strain for Cre mediated production of minicircle DNA. *BMC Biotechnol*, 2006, 6:17
- Flajolet M, Yang YL, Futter M, Nuangchamnong N, **Palaszewski I**, Snyder GL, Nairn AC, Greengard P. Direct interaction of a G Protein-Coupled Receptor with a Receptor Tyrosine Kinase results in synergistic ERK-mediated biological responses. In Überarbeitung.
- Publizierte Sequenzen **Palaszewski I**, Dame C. Homo sapiens GATA binding protein 4 (GATA4) mRNA, complete cds. GenBank accession number AY740706, publiziert am 11.01.2005.
- Konferenzbeiträge **Palaszewski I**, Wallach T, Hartmann A, Hussels C, Dame C. GATA-2 and GATA-3 activate erythropoietin receptor expression in neuronal cells in concert with cofactors. 16th European Student's Conference, 19. – 23. Oktober 2005
- Palaszewski I**, Wallach T, Hartmann A, Hussels C, Dame C. Mechanisms of erythropoietin receptor gene regulation in neuronal cells. 7th International Lübeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin and Other Hemopoietic Growth Factors. 7. – 9. September 2006.
- Palaszewski I**, Hartmann A, Wallach T, Hussels C, Dame C. Molekulare Mechanismen der Erythropoietin-Rezeptor Regulation in neuronalen Zellen. Eingereicht für die 33. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin. 14.-16. Juni 2007.
- Preise Erhard-Höpfner-Studienpreis für die Diplomarbeit
„Charakterisierung von mit dem Adenosin A2A Rezeptor interagierenden Proteinen mittels Yeast Two-Hybrid Methode“,
Februar 2004

Preis als „Session-Winner“ der Sessions Neurology III und Neurology IV, 16th European Student's Conference, 19. – 23. Oktober 2005

Stipendien

Stipendium der Carl Duisberg Gesellschaft für das Praxissemester im Ausland (August 2000 – Februar 2001)

Promotionsstipendium der Humboldt-Universität zu Berlin/Charité – Universitätsmedizin Berlin
(15. Juli 2003 – 15. Juli 2006)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe mich außerdem weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben noch besitze ich bereits einen entsprechenden Doktorgrad. Die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den

Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Dr. Christof Dame für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Arbeit und die sorgfältige Korrektur des Manuskripts. Außerdem möchte ich mich für seinen unermüdlichen Einsatz, mich zu fördern und zu motivieren, herzlich bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel, der bereit war, die Betreuung dieser Arbeit als Mitglied der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I zu übernehmen, und mir somit den Promotionsweg zum Dr. rer. nat. ermöglichte. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. Holger Scholz für die fachliche Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit danken.

Die Durchführung meiner Doktorarbeit wäre mir nicht möglich gewesen ohne die Förderung durch ein Promotionsstipendium, das mir durch ein Förderungsprogramm der Humboldt-Universität zu Berlin gewährt und später durch die Charité – Universitätsmedizin Berlin verlängert wurde. Das Forschungsprojekt wurde ferner durch Sachmittel seitens der Jürgen-Manchot-Stiftung (vormals PINGUIN-Stiftung) gefördert.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Freunde und Kollegen: an meinen Mann Thomas Wallach, ohne den die immunhistologischen Studien nicht möglich gewesen wären; Christiane Hussels, die dafür gesorgt hat, dass das Labor immer reibungslos funktioniert und für die Durchführung des ChIP-Assays; Anika Hartmann für ihren Einsatz als studentische Hilfskraft und die Fortführung des Projektes als Diplomandin; Juan Zhang für ihre Freundschaft; Hannes Sallmon fürs Korrekturlesen; Vicky Hoene für ihre Liebe zum Formatieren; Boris Thurisch, Katharina Bartz, Kristin Höwing, Malte Cremer, Juliane Langer, Sandy Schwerdtner-Hanßke und Anya Ivanova, dass sie alle Höhen und Tiefen mit mir durchgemacht haben; und schließlich Sven Weber für die Rettung meines Computers.

Zum Schluss noch einen herzlichen Dank an meine Familie und Freunde außerhalb der Forschungswelt, die immer für mich da waren.